

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLY MARIA WILKE RAMOS GOS

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS
DE *Vochysia divergens* Pohl**

CURITIBA

2017

FRANCIELLY MARIA WILKE RAMOS GOS

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS
DE *Vochysia divergens* Pohl**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, com ênfase em microbiologia da Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Chirlei Glienke
Co-orientadora: Dr^a Daiani C. Savi

CURITIBA

2017

Gos, Francielly Maria Wilke Ramos

Isolamento e bioprospecção de actinomicetos endofíticos de *Vochysia divergens* poh/ Francielly Maria Wilke Ramos Gos. – Curitiba, 2017.

93 f. : il. [algumas color.]; tabs. : color. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, no curso de Pós-graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke

Co-orientadora: Dr^a. Daiani C. Savi

Bibliografia: 71-77



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Isolamento e bioprospecção de actinomicetos
endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl”**

por

Francielly Maria Wilke Ramos Gos

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

Profa. Dra. Chirlei Glienke – Presidente

Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Curitiba, 27 de abril de 2017.

Dedico este trabalho ao Rafael meu esposo pela paciência,
dedicação e apoio nos momentos difíceis desta jornada
e principalmente por me incentivar na busca pela minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho e me incentivaram, meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente a Deus que é quem abre as porta e nos guia em todos os caminhos, colocando pessoas certas em nossas vidas.

À Prof^a Dr^a Chirlei Glienke, minha orientadora pelo suporte, apoio, paciência, ensino ao longo desta etapa e pela oportunidade de realização desse trabalho, muito obrigada.

À Dr^a Daiani C. Savi, minha co-orientadora, pela dedicação, suporte, sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho e por ser um exemplo, muito obrigada.

À minha banca de acompanhamento, Prof^a Dr^a Josiane Figueiredo e a Dr^a Keite Nogueira, pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

Às professoras Camila Marconi, Cristina Leise e Keite Nogueira pelo ensino, orientação e amizade na disciplina de prática de docência.

Às Professoras Dr^{as} Lygia Vitória Galli-Terasawa e Vanessa Kava-Cordeiro pela convivência, sugestões e auxílio dentro e fora do LabGeM.

Aos Professores do programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, que contribuíram para minha formação.

Ao Prof Dr^o Emanuel Maltempi de Souza, pela facilidade do uso do sequenciador;

Ao Valter Antonio Baura pelo auxílio técnico e científico na parte do sequenciamento.

Aos professores Andrei e Magda pela amizade e contribuições com os ensaios.

Aos amigos Alan, Regiane, Sabrina e Michelle pelo companheirismo e conversas de corredor, muito importante.

Aos meus amigos do LabGeM pela agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis, Miriam, Elvio, Desirrê, Sandriele, Lorena, Alan, Danielle, Beatriz, Daiani, Juliana Marta, Aliandra, Marcos e demais colegas pela amizade e apoio no laboratório.

À minha amiga Juliana Marta pelos momentos alegres no trabalho, pelo carinho, companheirismo, pelo conforto durante as minhas preocupações e receios dentro e

fora do laboratório, bem como pelas excelentes idéias que muito contribuíram com este trabalho.

Ao Amigo Marcos Paulo Rosa pela amizade, agradeço também a disposição, auxílio e parceria nos ensaios.

Ao Amigo Rodrigo Aluizio pela amizade, apoio no laboratório, auxílio com as análises estatísticas e filogenéticas, obrigada.

Aos meus pais, Sonia e Herbert, por terem ensinado a buscar meus ideais e pelo esforço e compreensão, pelo amor e cuidado.

Ao meu companheiro Rafael Gos, pela compreensão, pelo carinho e pela sua admirável paciência, sobretudo ao apoio e contribuição para a realização deste ideal.

Aos meus amigos e familiares pelo carinho, compreensão e incentivo nesse período de ausência.

A CAPES e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O Pantanal é uma planície de inundação periódica detentora de uma biodiversidade singular, e possui diversas plantas com conhecimento tradicional associado às suas propriedades medicinais. Entre estas, a planta *Vochysia divergens*, conhecida como Cambará, é utilizada em tratamentos de resfriados, tosse, febre e pneumonia, e se mostra promissora para a prospecção de microrganismos. Dos quais os endófitos isolados de plantas medicinais têm sido associados a uma ampla gama de metabólitos secundários com atividade biológica. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o isolamento e a bioprospecção de actinomicetos endofíticos da planta medicinal *V. divergens*. Um total de 10 isolados obtidos foram identificados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise morfológica, como *Aeromicrobium ponti*, *Williamsia serinedens*, *Streptomyces thermocarboxydus*, *Microbacterium* sp., *Sphaerisporangium* sp., *Micrococcus* sp., *Microbispora* sp. e *Actinomadura* sp.. Afim de selecionar a melhor condição de cultivo para produção de metabólitos secundários, foram avaliadas duas condições diferentes de meio de cultura e temperatura. Todas as condições utilizadas resultaram na produção de metabólitos com atividade biológica, porém os melhores resultados foram no cultivo em caldo SG (Soja e glucose) a 36°C. Nestas condições, o extrato a partir da fermentação da linhagem *Aeromicrobium ponti* (LGMB491) apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), com CIM de 0,02mg/mL e 0,04mg/mL, respectivamente. O extrato oriundo da linhagem *Microbacterium* sp. (LGMB471) apresentou inibição total do crescimento micelial do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* com CIM de 0,16mg/mL. Neste estudo, o conhecimento da comunidade endofítica da planta medicinal *V. divergens* foi ampliado por meio do isolamento de novos gêneros associados a esta planta, alguns deles isolados pela primeira vez como endófitos.

Palavras chaves: *Vochysia divergens*. Pantanal. Actinomicetos endofíticos. MRSA.

ABSTRACT

The Pantanal is a periodic flood plain with a unique biodiversity, and has several plants with traditional knowledge associated with its medicinal properties. The plant *Vochysia divergens*, known as Cambará, is used for treatment of colds, cough, fever and pneumonia, and is very promising for microorganisms' prospection. Endophytic microorganisms isolated from medicinal plants have been studied due to the production of a wide range of secondary metabolites with biological activity. In this context, the present work aimed at the isolation and bioprospection of endophytic actinomycetes from medicinal plant *V. divergens*. Ten strains of endophytic actinomycetes were identified by partial 16S rRNA gene sequencing and morphological analysis, as belonging to *Aeromicrobium ponti*, *Williamsia serinedens*, *Streptomyces thermocarboxydus*, *Microbacterium* sp., *Sphaerisporangium* sp., *Micrococcus* sp., *Microbispora* sp. and *Actinomadura* sp. In order to select the best culture conditions for production of secondary metabolites, two different culture media and two temperatures were evaluated. All the conditions used resulted in the production of metabolites with biological activity, but the best conditions are cultivation in SG broth at 36°C. In these conditions, the extract from the fermentation of *Aeromicrobium ponti* (LGMB491) showed high activity against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), with MIC of 0.02mg/mL and 0.04mg/mL, respectively. The extract from the *Microbacterium* sp. (LGMB471) showed total inhibition of the mycelial growth of phytopathogen *Phyllosticta citricarpa* with MIC of 0.16mg/mL. In this study, we broadened the knowledge about the endophytic community of the medicinal plant *V. divergens* through the isolation of rare actinomycetes, some of them isolated for the first time as endophytes.

Key-words: *Vochysia divergens*. Pantanal. Endophytes actinomycetes. MRSA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXTENSÃO DO PANTANAL NO BRASIL	19
FIGURA 2 – PLANTA MEDICINAL <i>Vochysia divergens</i> DA REGIÃO DO ABOBRAL NO PANTANAL	20
FIGURA 3 – LARANJA COM OS SINTOMAS DA DOENÇA MANCHA PRETA EM CITROS(A) E PÉTALAS DE CITROS APRESENTANDO A DOENÇA PODRIDÃO FLORAL (B)	25
FIGURA 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS LGMB466 E LGMB487 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Actinomadura</i>	35
FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB491 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Aeromicrobium</i>	37
FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB471 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Microbacterium</i>	38
FIGURA 7 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS LGMB461 E LGMB465 E 16S rRNA, <i>gyrB</i> e <i>rpoB</i> PARA TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Microbispora</i>	39
FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB485 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Micrococcus</i>	40
FIGURA 9 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB482 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Sphaerisporangium</i>	41

FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB483 E 23 LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Streptomyces</i>	42
FIGURA 11 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB479 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO <i>Williamsia</i>	43
FIGURA 12 - ANÁLISE MACRO MORFOLÓGICA DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS, 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO NOS MEIOS DE CULTURA ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 A 28°C	46
FIGURA 13 - CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO <i>Phyllosticta citricarpa</i> APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA A 28°C, NA AUSÊNCIA (A) E PRESENÇA (B) DO EXTRATO PRODUZIDO PELO ACTINOMICETO <i>Microbacterium</i> sp. (LGMB471) CULTIVADO EM CALDO SG, A 36°C	50
FIGURA 14 - ZONA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MILIMETROS (mm) DO FITOPATÓGENO <i>Colletotrichum abscissum</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 28°C E 36°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.....	50
FIGURA 15 - ZONA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MILIMETROS mm DO FITOPATÓGENO <i>Phyllosticta citricarpa</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 28°C E 36°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.....	51
FIGURA 16 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Staphylococcus aureus</i> SENSÍVEL A METICILINA (MSSA) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	52
FIGURA 17 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A METICILINA (MRSA) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS	

CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	53
FIGURA 18 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Escherichia coli</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	54
FIGURA 19 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	55
FIGURA 20 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Acinetobacter baumannii</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	56
FIGURA 21- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Candida albicans</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	57
FIGURA 22 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Enterobacter cloacae</i> produtor da enzima <i>VIM</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.....	58
FIGURA 23 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A	59
FIGURA 24 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtor da enzima <i>KPC</i> NA PRESENÇA E	

AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.....	60
--	----

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO, CÓDIGO DE ACESSO DO GenBank (NCBI), REGIÃO DE COLETA E MATERIAL DE ORIGEM	33
TABELA 2 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS, 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO NOS MEIOS DE CULTURAISP2, ISP3, ISP4, ISP5 A 28°C.	45
TABELA 3 - ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS A 11 ANTIBIÓTICOS	47
TABELA 4 - PESOS SECOS OBTIDOSAPARTIR DA FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS NOS MEIOS SG E R5A NAS TEMPERATURAS 28°C E 36°C	48
TABELA 5 – INIBIÇÃO EM PORCENTAGEM DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS FITOPATÓGENOS <i>Colletotrichum abscissum</i> E <i>Phyllosticta citricarpa</i> POR EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.....	49
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA (CBM) DO EXTRATO A PARTIR DA LINHAGEM LGMB491 (<i>Aeromicrobium</i> <i>ponti</i>) CULTIVADA EM MEIO SG à 36°C, CONTRA PATÓGENOS CLINICOS	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	PANTANAL E <i>Vochysia divergens</i> Pohl	18
2.2	MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	20
2.3	ACTINOMICETOS	21
2.4	ACTINOMICETOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
2.5	RESISTÊNCIA BACTERIANA	23
2.6	FITOPATÓGENOS DE CITROS	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVOS GERAIS	26
3.2	METAS	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	COLETA E ISOLAMENTO.....	27
4.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	27
4.2.1	Caracterização molecular	27
4.2.2	Caracterização Morfológica	29
4.2.3	Teste de Sensibilidade dos actinomicetos a Antibióticos.....	29
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	30
4.3.1	Obtenção de metabólitos secundários.....	30
4.3.2	Atividade dos extratos dos actinomicetos contra fitopatógenos.....	30
4.3.3	Atividade antibacteriana contra patógenos de interesse clínico – Teste de difusão em disco	30
4.3.4	CIM– Concentração inibitória mínima, CBM– Concentração bactericida mínima e CFM – Concentração fungicida mínima	31
4.3.5	Análises estatísticas	32
5	RESULTADOS	33
5.1	COLETA E ISOLAMENTO.....	33
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	33
5.2.1	Caracterização Molecular	33

5.2.1.1	Actinomadura (LGMB466 e LGMB487).....	34
5.2.1.2	Aeromicrobium (LGMB491).....	34
5.2.1.3	<i>Microbacterium</i> (LGMB471)	36
5.2.1.4	<i>Microbispora</i> (LGMB461 e LGMB465)	36
5.2.1.5	<i>Micrococcus</i> (LGMB485)	37
5.2.1.6	<i>Sphaerisporangium</i> (LGMB482).....	41
5.2.1.7	<i>Streptomyces</i> (LGMB483)	42
5.2.1.8	<i>Williamsia</i> (LGMB479).....	43
5.2.2.	Caracterização morfológia	44
5.2.3	Teste de Sensibilidade dos actinomicetos a antibióticos	47
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	48
5.4.1	Produção de extratos.....	48
5.4.2	Atividade dos extratos contra fitopatógenos	48
5.4.3	Atividade antibacteriana contra patógenos clínicos	52
6	DISCUSSÃO	62
6.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ..	62
6.2	TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ACTINOMICETOS A ANTIBIÓTICOS	64
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	65
6.3.1	Considerações finais	68
7	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Actinomadura</i> (1 de 10)	78
	ANEXO 2 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Aeromicrobium</i>	84
	ANEXO 3 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, espécies localizadas no clado juntamente com LGMB471 – <i>Microbacterium</i> sp.	85
	ANEXO 4 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Microbispora</i>	86

ANEXO 5 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Micrococcus</i>	87
ANEXO 6 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Sphaerisporangium</i>	88
ANEXO 7 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Streptomyces</i>	89
ANEXO 8 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero <i>Williamsia</i>	90
ANEXO 9 - Atividade antimicrobiana de extratos dos actinomicetos endofíticos produzidos em diferentes meios e temperaturas sobre patógenos clínicos de interesse.....	91

1 INTRODUÇÃO

Actinomicetos endofíticos são microrganismos que habitam tecidos internos de plantas sem causar efeitos negativos e possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários de interesse para indústria agrônômica e farmacêutica (GOLINSKA et al., 2015). De acordo com Adegboye e Babalola (2013) dois terços dos antibióticos conhecidos são provenientes de actinomicetos. Além disso, já foram relatados aproximadamente 23.000 metabólitos secundários com atividade biológica produzidos por microorganismos, e destes, mais de 10.000 foram produzidos por actinomicetos (MOHSENI et al., 2013).

Uma das formas de associar valor econômico a biodiversidade é a bioprospecção, que é relevante para muitos setores e atividades, tais como, biotecnologia, agricultura, indústria farmacêutica, e biorremediação. O setor farmacêutico mundial depende em grande parte da bioprospecção, uma vez que mais da metade dos fármacos existentes foram desenvolvidos a partir de moléculas biológicas (SACCARO JUNIOR, 2012). Neste setor, a bioprospecção de compostos vem ganhando cada vez mais importância, principalmente para o tratamento de infecções hospitalares causadas por microrganismos resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae*, produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase) (KAVITHA et al., 2010; SAVI et al., 2015a; WHO, 2016). Para a agricultura, a prospecção de compostos para o combate a fitopatógenos também vem se intensificando. O controle ineficaz de fitopatógenos tem sido associados a elevadas perdas econômicas, e medidas alternativas são necessárias para o controle de doenças, como a mancha preta dos citros, causada pelo fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* e a podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum abscissum* (FAGAN; GOES, 2000; SCALOPPI, 2006; FUNDECITRUS, 2017).

Desta forma, a busca por actinomicetos e de seus compostos em ambientes pouco explorados, como as regiões de zonas alagáveis, está associada à descoberta de novas espécies e compostos com atividade biológica (SAVI et al., 2016; HOKAMA et al., 2016).

O Pantanal é uma planície inundável que possui duas características climáticas anuais, os períodos de cheia e de seca. Em consequência dessa sazonalidade esta região tem uma peculiar diversidade biológica em relação à sua

fauna e flora (SILVA et al., 2000; ALHO, 2008; JORGE, 2004). Segundo Arieira e Cunha (2006) apenas 5% das espécies arbóreas no Pantanal têm capacidade de sobreviver ao estresse causado pelos períodos de seca e inundação. Um exemplo é a planta medicinal *Vochysia divergens*, comumente utilizada para fins terapêuticos (xaropes e chás) no tratamento de resfriados, tosse, febre, pneumonia e outros (POTT et al., 2004). Em um estudo realizado com esta planta, Savi et al.(2015a, 2015b) exploraram actinomicetos endofíticos de três gêneros e identificaram a produção de metabólitos secundários com atividade biológica produzidos por eles.

Com base nestes dados, o foco deste estudo é ampliar o conhecimento sobre a comunidade endofítica de actinomicetos da planta medicinal *Vochysia divergens* e explorar os metabólitos secundários produzidos em diferentes condições de cultura contra patógenos clínicos relacionado a resistência a antibióticos e dois patógenos de citros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PANTANAL E *Vochysia divergens* Pohl

O Pantanal é uma planície inundável com extensão de aproximadamente 147.574km², que durante o ano possui duas características climáticas marcantes, uma delas é o período de cheia que compreende os meses entre novembro e março (ALHO, 2008). A cheia ocorre devido ao nível elevado das chuvas, causando o transbordamento dos rios. Pelo fato do solo possuir uma característica argilosa e arenosa, a absorção da água é reduzida, por consequência, aproximadamente 80% do Pantanal é ocupado pela água nesta época do ano (SILVA et al., 2000). Durante os meses de maio a outubro, o clima mais seco e quente causa a evaporação da água e os rios retornam aos níveis normais (FIGURA 1).

Por conta desta sazonalidade, o Pantanal possui uma grande diversidade biológica em relação à sua fauna e flora (ALHO, 2008). Os ecossistemas únicos encontrados no Pantanal são resultados de fatores como a topografia, níveis variáveis de inundação e a intervenção do homem, formando assim lagoas (permanentes, temporárias, salobras), cerrados, matas e regiões arenosas (JORGE, 2004; ALHO, 2008).

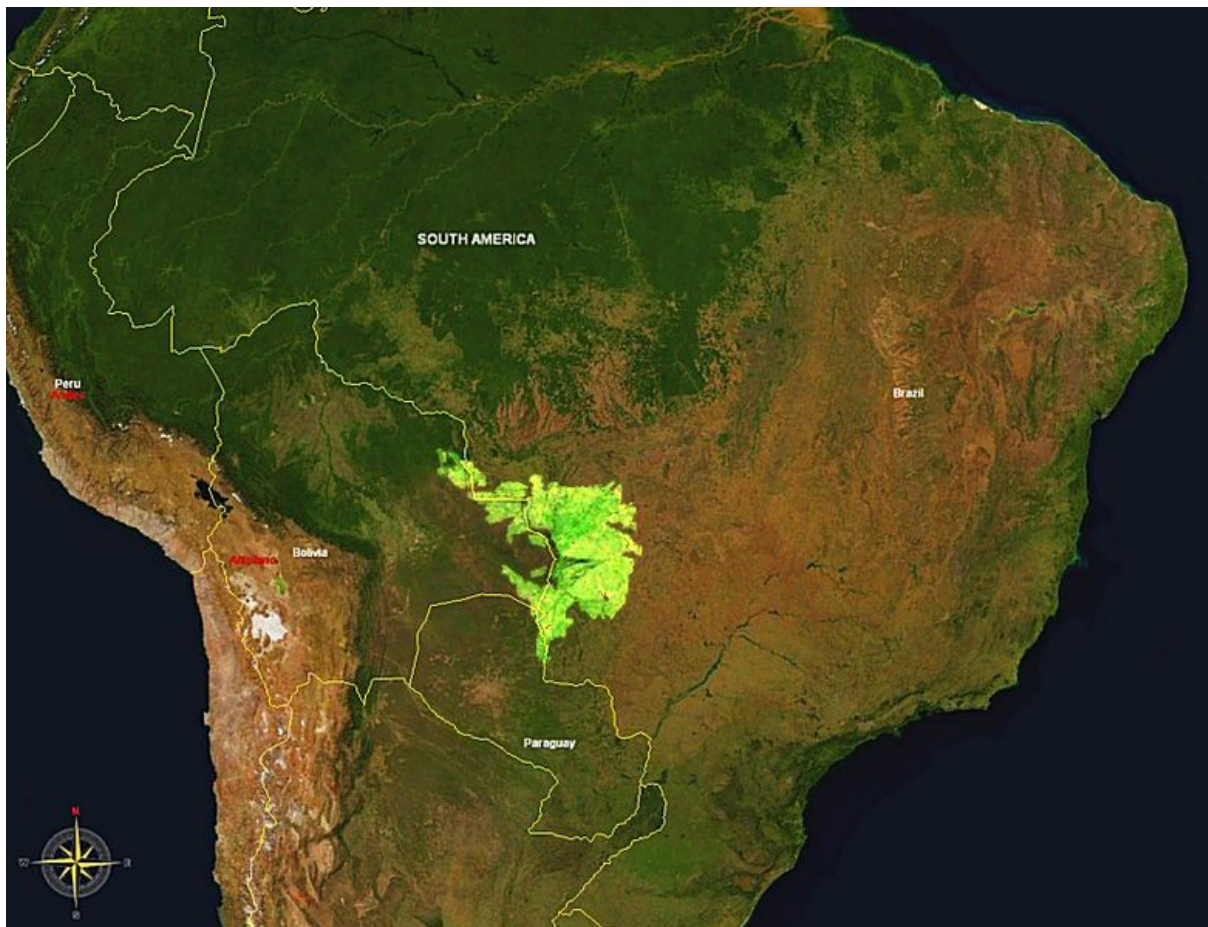
Segundo Arieira e Cunha (2006) devido a sazonalidade da região, apenas 5% das espécies arbóreas são encontradas nas áreas de inundação prolongada, outros 30% em áreas raramente inundadas e as demais são encontradas em outras regiões. Entre as plantas capazes de sobreviver à inundação está a *Vochysia divergens* (SILVA et al, 2000), que sobrevive ao estresse causado pelos períodos de seca e cheia (ARIEIRA; CUNHA, 2006).

A planta *V. divergens* (FIGURA 2) é amplamente conhecida na região do Pantanal como Cambará, e pode ser utilizada tanto para construções (barcos, palanques, casas ente outras), como para fins terapêuticos (xaropes e chás) no tratamento de infecções respiratórias, tais como gripes, tosses, pneumonias e resfriados (POTT; et al., 2004). Estudos realizados com a planta apresentaram propriedades antifúngicas, antibacterianas, analgésicas e anti-inflamatórias (HESS et al., 1995; BORTALANZA et al., 2002).

Em estudos de bioprospecção de microrganismos endofíticos realizados com a planta *V. divergens* Savi et al. (2015a, 2015b) isolaram actinomicetos com

capacidade de produzir metabólitos secundários que apresentaram atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante. Desta mesma planta, Hokama et al. (2016) realizaram o isolamento de fungos endofíticos que apresentaram atividade contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. Estes dados demonstram a importância da comunidade endofítica desta planta e deste bioma como potencial a ser explorado.

FIGURA 1 – EXTENSÃO DO PANTANAL NO BRASIL



FONTE: https://pt.wikipedia.org/wiki/Pantanal#/media/File:Pantanal_55.76W_15.40S.jpg (P199 - NASA WorldWind and personal editing). Acesso em: 13 mar. 2017.

NOTA: Pantanal em cor verde claro.

FIGURA 2 – PLANTA MEDICINAL *Vochysia divergens* DA REGIÃO DO ABOBRAL NO PANTANAL



FONTE: Acervo pessoal de Chirlei Glienke (2014)

NOTA: Flexa vermelha indica a árvore de *Vochysia divergens*.

2.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Endófitos são microrganismos que habitam tecidos internos de plantas sem causar efeitos negativos sobre estas, decorrente de uma relação de mutualismo que beneficia o microrganismo e o hospedeiro (STROBEL et al., 2004; FIRÁKOVÁ et al., 2007).

Estudos realizados por Strobel et al. (2003) sugerem que existe pelo menos um microrganismo endofítico para cada uma das 300.000 espécies de plantas estimadas no planeta, porém ainda é escasso o conhecimento sobre a comunidade endofítica em diversas plantas e biomas. Além disso, estudos correlacionam a presença de microrganismos endofíticos em plantas medicinais e os metabólitos produzidos por ele, por exemplo, a planta *Taxus brevifolia* e o fungo *Taxomyces andreanae* endofítico desta planta. Ambos já descritos como produtores de taxol, um composto anticâncerígeno de alto valor agregado (STROBEL et al., 2004)

Diferente de fungos que são e foram amplamente estudados como endofíticos, uma parcela ainda pouco explorada destes microrganismos são actinomicetos endofíticos, que vem sendo estudados devido a capacidade de

produção de metabólitos de interesse para a indústria agronômica e farmacêutica (GOLINSKA et al., 2015).

2.3 ACTINOMICETOS

Actinomicetos são microrganismos procariotos, gram positivos, alguns gêneros têm morfologia filamentosa e produzem esporos. Outros gêneros possuem morfologia de bacilos alongados. São microrganismos encontrados em vários tipos de solo, em água doce e do mar, em folhas e raízes (KIM et al., 1998, YASSIN et al., 2007; LEE; LEE, 2008; PASSARI et al., 2015).

Segundo Jose e Jebakumar (2013) alguns gêneros de actinomicetos são considerados raros, pois possuem menor probabilidade de isolamento do que um estreptomiceto e podem ser importantes fontes de metabólitos secundários desconhecidos (TIWARI et al., 2011).

Como característica marcante, actinomicetos possuem elevada concentração de guaninas e citosinas em seu DNA, e sua identificação pode ser realizada através de análises morfológicas (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; HOLT et al., 1994; ADEGBOYE; BABALOLA, 2013) e moleculares.

A identificação molecular pode ser realizada por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA, considerado gene de escolha para a identificação bacteriana, por permitir a diferenciação dos gêneros e de algumas espécies de procariotos (MADIGAN et al., 2010). Em algumas situações o gene 16S rRNA não possui informação suficiente para a diferenciação entre as espécies de um gênero e nestes casos, a análise de sequenciamento multi locos (MLSA) pode ser empregada (MUN et al. 2007; SAVI et al, 2016).

Para a descrição de novas espécies a análise do gene 16S rRNA juntamente com a técnica de hibridização DNA-DNA (DDH) são utilizadas como procedimento padrão. Entretanto, alguns pesquisadores tem sugerido que a MLSA seja utilizada ao invés da técnica de DDH, pois para a análise de DDH é necessário a utilização de linhagens de tipo que apresentam alto nível de similaridade com a espécie isolada. Além disso, a técnica MLSA requer apenas sequências dos genes disponíveis em banco de dados, facilitando o acesso e agilizando o processo de descrição de espécies (MUN et al. 2007, LEE et al. 2008, HIRSCH; VALDÉS 2010, SAVI et al, 2016).

2.4 ACTINOMICETOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos produzidos por microrganismos são caracterizados como primários e secundários. Metabólitos primários são essenciais para a sobrevivência e manutenção do organismo, e metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos em seu desenvolvimento, crescimento ou reprodução (NETZKER et al., 2015) no entanto conferem vantagens ao organismo. Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular, e podem apresentar atividade biológica, a produção deste metabólitos está diretamente relacionada a condições de cultivo e interação entre espécies (BRAKHAGE, 2013).

Adegboye e Babalola (2013) explicam que os metabólitos secundários são catalisados por enzimas codificadas por diferentes vias metabólicas, sendo que estas envolvem principalmente os genes PKS (*Polyketide synthase*) classificados em 3 tipos: I, II e III) e NRPS (*Nonribosomal peptide synthetase*). Estes genes são encontrados em *clusters* e são responsáveis pela produção de um grande número de antibióticos.

Segundo Netzker et al. (2015) os microrganismos possuem clusters de genes que em condições de cultura pura permanecem silenciados. Quando em co-cultivo, ocorre interação entre espécies e a ativação de alguns clusters antes silenciados e diferentes vias metabólicas capazes de produzir novos compostos (ABDELMOHSEN et al., 2015).

Os actinomicetos são conhecidos como grande produtores de metabólitos secundários e de acordo com Adegboye e Babalola (2013), quase dois terços de todos os antibióticos conhecidos são produzidos por eles. Segundo Mohseni et al. (2013) aproximadamente 23.000 metabólitos secundários produzidos por microrganismos foram relatados. Destes, mais de 10.000 são produzidos por actinomicetos e aproximadamente 7.600 por espécies do gênero *Streptomyces*.

Metabólitos secundários produzidos por actinomicetos vem sendo utilizados pela indústria farmacêutica, como antibióticos, antifúngicos, antivirais, antiprotozoários, imunossupressores (BALTZ, 2007; ADEGBOYE; BABALOLA, 2013; SAVI et al., 2015). Como exemplo, o antibiótico tetraciclina que foi primeiramente isolado a partir da espécie *Streptomyces rimosus* pela via biosintética do PKS II, já o antibiótico Pristinamycin II A foi produzido a partir da espécie *Streptomyces pristinaespiralis* pelas vias NRPS-PKS I (KATZ; BALTZ, 2016)

Devido a necessidade de novos compostos para tratamentos na área clínica e agropecuária, a busca de novas espécies de actinomicetos e seus metabólitos tem ganhado importância (KAVITHA et al., 2010; RONG; HUANG, 2012; SAVI et al., 2015a).

2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O uso indiscriminado de antibióticos levou a seleção de um grande número de microrganismos resistentes, causando o aumento no tempo dos tratamentos hospitalares e consequentemente nos custos (RAGBETLI et al., 2016; WHO, 2016).

Algumas bactérias encontradas em ambiente hospitalar como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase) e *Stenotrophomonas maltophilia*, são conhecidas pela resistência a antibióticos e algumas delas pela capacidade de formar biofilmes (DUCEL et al., 2002; WHO, 2016).

A bactéria *S. aureus* pode ser encontrada como parte da microbiota normal e é considerada um patógeno oportunista, podendo causar desde infecções de pele, até infecções sistêmicas como pneumonia (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Essa bactéria tem ganhado maior importância devido a infecções hospitalares causadas por linhagens multirresistentes (SANTOS et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estudos relatam a resistência de *S. aureus* a diversos antibióticos além da Meticilina, como aminoglicosídeos, glicopeptídeos e algumas quinolonas (RAGBETLI et al., 2016; WHO, 2017a). O aumento da resistência de *S. aureus* a antibióticos como a vancomicina gera preocupações, pois no momento é a droga de escolha para o tratamento (RAGBETLI et al., 2016; WHO, 2017b; ANVISA, 2017).

A bactéria gram negativa *Klebsiella pneumoniae* está associada a infecções como pneumonia, meningite e sepse, e além da resistência a Carbapenems, também tem apresentado resistência a antibióticos como a gentamicina. *K. pneumoniae* é uma das bactérias mais preocupantes em relação as infecções hospitalares, juntamente com as bactérias *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e vancomicina (VRSA) (ANVISA, 2012; WHO, 2015).

As bactérias *S. maltophilia* e *A. baumannii* são bacilos gram negativos, também conhecidos pela capacidade de formar biofilmes e pela resistência

intrínseca a diversos antimicrobianos (BROOKE, 2012;CLSI, 2015). A bactéria *A. baumannii* pode ser encontrada na microbiota normal humana e ocasionar diversos tipos de infecções como, infecções de pele, no trato urinário e pneumonias, bacteremias. É um patógeno oportunista e em pessoas imunodeficientes pode causar sepse. Esta bactéria apresenta resistência a diversos antimicrobianos como penicilina, ampicilina, cloranfenicol e aminoglicosídeos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; RYNGA; SHARIFF; MONORAMA, 2015). *S. maltophilia* acomete principalmente pacientes em tratamento hospitalar e é encontrada frequentemente em superfícies de cateters devido a formação de biofilmes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; BROOKE, 2012).

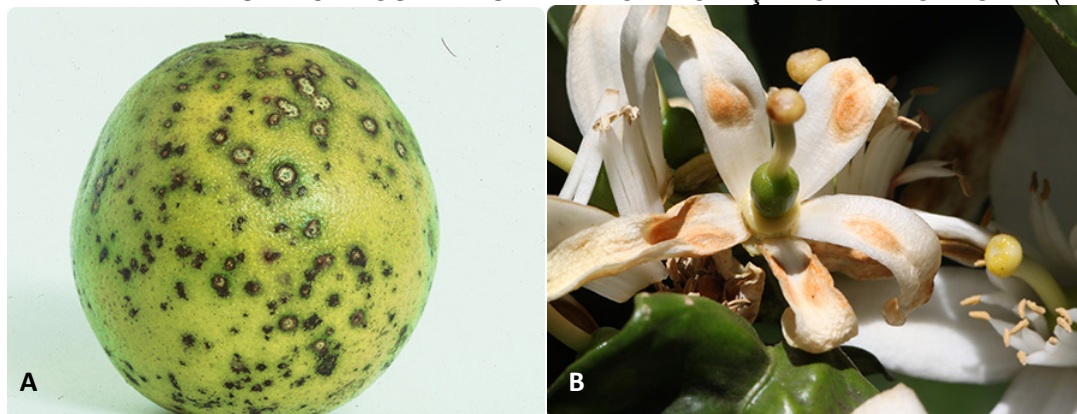
Devido à carência de antibióticos efetivos para o tratamento de infecções bacterianas, são necessárias pesquisas envolvendo a bioprospecção de novos compostos que sejam efetivos nos tratamentos contra estes microrganismos (KAVITHA et al., 2010).

2.6 FITOPATÓGENOS DE CITROS

O Brasil está entre os principais produtores e exportadores de citros no mundo, contribuindo principalmente com a exportação do suco de laranja, seguido da fruta *in natura*. Desta forma, este setor da agricultura tem grande importância para o desenvolvimento econômico do país (NEVES et al., 2010).

A mancha preta em citros (MPC) e podridão floral dos citros (PFD, também conhecida como queda prematura dos frutos), são duas doenças dentre várias existentes que geram grandes prejuízos econômicos na produção de citros (FIGURA 1) (FUNDECITRUS, 2017).

FIGURA 3 – LARANJA COM O SINTOMAS DA DOENÇA MANCHA PRETA EM CITROS (A) E PÉTALAS DE CITROS APRESENTANDO A DOENÇA PODRIDÃO FLORAL (B)



FONTE: FUNDECITRUS (2017).

A doença mancha preta dos citros (MPC) é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, e como o próprio nome da doença diz, o fungo causa lesão na casca do fruto, formando pintas pretas. Esta lesão não gera dano na região interna do fruto, não alterando o sabor e característica do mesmo (FAGAN; GOES, 2000; FUNDECITRUS, 2017). No entanto, esta doença está relacionada com um impacto na exportação de frutos para a União Européia, devido ao fato do fungo ser uma praga quarentenária A1 naquela região (SCALOPPI, 2006; IPPC, 2014).

A doença podridão floral dos citros (PFD) no Brasil é causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum abscissum*, causando o apodrecimento das pétalas da flor de citros e os frutos novos caem prematuramente, comprometendo a produção (FEICHTENBERGER et al., 2005; FUNDECITRUS, 2017).

Alguns estudos já vêm sendo realizados pelo nosso grupo na busca de novas estratégias para controlar o patógeno de citros *Phyllosticta citricarpa* através do controle biológico (SAVI et al., 2015a, SAVI et al. 2015b, PEÑA et al., 2016, SANTOS et al., 2016, HOKAMA et al., 2016, TONIAL et al., 2017). Atualmente o controle convencional deste fitopatógeno é realizado através da aplicação de fungicidas, sendo que alguns destes não são recomendados para a utilização quando os frutos são exportados. Além disso, já existem relatos sobre a resistência destes fungos aos benzimidazóis (POSSIEDE, et al., 2009; HOLMES et al., 2016; FUNDECITRUS, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Ampliar o conhecimento sobre a comunidade endofítica de actinomicetos da planta medicinal *Vochysia divergens* localizada no Pantanal Sul-mato-grossense e bioprospectar os metabólitos secundários produzidos por estes microrganismos quanto a ação biológica.

3.2 METAS

- Isolar actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*.
- Identificar os isolados por análise morfológica e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.
- Obter metabólitos secundários dos isolados em diferentes condições de crescimento.
- Avaliar a atividade biológica dos metabólitos secundários contra microrganismos de interesse clínico e agrônômico.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E ISOLAMENTO

As coletas foram realizadas em duas regiões pertencentes ao Pantanal Sul-mato-grossense, Abobral e São Bento. Um total de 11 árvores da região do Abobral (19°30'09.5"S, 57°02'32.2"W) e 10 árvores da região de São Bento (19°28'53.9"S, 57°02'36.9"W) foram selecionadas (FIGURA 1, 2). Para o isolamento foram coletadas folhas que não apresentaram marcas, injúrias ou lesões. O processo de eliminação de microrganismos epifíticos foi baseado na metodologia descrita por Petrini (1986). Após a assepsia as folhas foram fragmentadas em partes de 8x8 mm e depositadas em placas de petri contendo meio de cultura AAC (Ágar amido caseína) (MOHSENI et al., 2013), acrescido de 50µg/mL de ácido nalidíxico (para a inibição do crescimento bacteriano) e 50 µg/mL de ciclohexamida (para inibição do crescimento fúngico). As placas foram incubadas em estufa por 30 dias a 28°C, e com verificação diária do crescimento de colônias actinomicetos. Os isolados foram transferidos e mantidos em meio AAC e depositados na coleção de culturas do LabGeM, da Universidade Federal do Paraná (<http://www.labgem.ufpr.br/>).

A frequência de isolamento (FI) foi obtida a partir do número de actinomicetos isolados em relação ao número de fragmentos semeados, conforme fórmula:

$$FI(\%) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ actinomic etos isolados}}{n^{\circ} \text{ de fragmentos semeados}} \right) \times 100$$

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos actinomicetos foi realizada por meio de análises morfológica e molecular.

4.2.1 Caracterização molecular

O DNA genômico foi extraído a partir de colônias com 3 a 5 dias de cultivo, baseado no protocolo de Raeder e Broda (1985), com modificações realizadas por Glienke (1999). A concentração e qualidade do DNA foram determinadas por

eletroforese em gel de agarose 1%. A PCR para amplificação do gene 16S do rRNA foi realizada utilizando os oligonucleotídeos 9F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (LEE et al., 2008), em Termociclador Labnet modelo *MultiGene gradient* consistindo em desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 15s a 94°C, 45s a 93°C, 45s a 51°C, 2min a 72°C e extensão final de 5min a 72°C. A amplificação do fragmento desejado foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™, observado em transiluminador de luz ultravioleta e comparado com marcador de peso molecular de 100 pb Ladder (Kasvi).

O produto da PCR foi purificado utilizando as enzimas Exo1 e FastAP™ (GE Healthcare, USA). Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye® Terminator v3.1. O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando o polímero Sephadex G50. A leitura da reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático ABI3500® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas utilizando os softwares Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013) e BioEdit (HALL, 1999), para a obtenção da sequência consensus e previamente comparada com sequências disponíveis no banco de dados GenBank, ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências das linhagens de referência foram encontradas no banco de dados LPSN (List of prokaryotic Names with Standing Nomenclature – <http://www.bacterio.net/>). Para a análise de Inferência Bayesiana foi utilizado o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), para gerar as árvores filogenéticas com valores de probabilidade posteriori usando o software MrBayes v3.2.6 x86 (Ronquist et al., 2011). O modelo evolutivo GTR foi determinado usando o Akaike Information Criterion (AIC) calculado no software RStudio (R Studio Team, 2015), com o pacote phangorn (SCHLIEP, 2011). Os grupos externos foram determinados conforme literatura base para cada gênero trabalhado. A análise de porcentagem de similaridade foi estimada utilizando o Software RStudio (R Studio Team 2015), e o pacote pegas (PARADIS, 2010) foi utilizado na análise. Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank, e os números de acesso estão listados na TABELA 1.

4.2.2 Caracterização Morfológica

Para a avaliação da macromorfologia foram utilizados quatro meios de culturas: ISP2 - Ágar extrato de levedura-malte; ISP3 - Ágar aveia; ISP4 - Ágar Amido e sais inorgânico; ISP5 - Ágar Glicerol-Asparagina (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). O repique foi realizado através do estriamento do inóculo sobre a placa, as quais foram incubadas a 28°C e as características morfológicas avaliadas em 21 dias. As características avaliadas foram crescimento, formação e cor dos esporos, formação de micélio aéreo e micélio vegetativo. O meio ISP2 foi selecionado para a realização do teste de micro cultivo e avaliação micro morfológica baseada na técnica de Kern e Blevins (1999).

4.2.3 Teste de Sensibilidade dos actinomicetos a Antibióticos

Os isolados foram inoculados no meio líquido ISP2, cultivados a 28°C, a 250 rpm, de 7 a 10 dias de acordo com a metodologia utilizada por PASSARI et al. (2015). O teste de sensibilidade foi realizado utilizando a metodologia de disco difusão: os inóculos foram semeados com *swab* sobre a placa contendo meio ágar Muller Hinton e discos impregnados com antibióticos foram dispostos sobre o inóculo. As placas foram incubadas a 36°C durante 24 h.

Os antibióticos utilizados foram: Aminoglicosídeos (Streptomicina, EST 10µg; Gentamicina, GEN 10µg), Anfencóis (Cloranfenicol, CLO 30µg), Carbapenem (Meropenem, MER 10µg), Cefalosporinas 3ªG (Ceftazidima, CAZ 30µg), Glicopeptídeos (Vancomicina, VAN, 30µg), Macrolídeo (Rifampicina, RIF 5µg), Penicilinas (Ampicilina, AMP 10µg; Oxacilina, OXA 1µg), Quinolonas (Ácido nalidíxico, NAL 30µg) e Tetraciclina (Tetraciclina, TET 30µg). A análise foi realizada pela medida do halo de inibição, considerando: S – Sensível (>20 mm), I – Intermediário (10 – 19,9mm) e R – Resistente (0,0 – 9,9mm)(WILLIAMS et al., 1989).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 Obtenção de metabólitos secundários

Os isolados foram inoculados em 50 mL de meio líquido SG (SHAABAN et al., 2011), incubados por 3 dias a 36°C, em 180rpm. Posteriormente, deste pré-cultivo 1mL foi inoculado em 100 mL dos meios SG e R5A (FERNANDEZ, 1998), e incubados por 10 dias nas temperaturas de 28°C e 36°C em 180rpm.

Após o período de incubação foi realizada a filtração do cultivo em papel filtro Whatman nº4 para separar o meio fermentado da massa celular. Para a obtenção do extrato, ao volume de filtrado obtido foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila e particionado 3 vezes, com o auxílio de um balão de separação (SAVI et al., 2015a). A rotaevaporação do solvente foi realizada a 45°C e o resíduo da evaporação foi transferido para um recipiente previamente pesado para determinação da concentração do extrato seco. Os extratos foram pesados e diluídos em metanol em concentração final de 10mg/mL.

4.3.2 Atividade dos extratos dos actinomicetos contra fitopatógenos

A atividade antifúngica foi avaliada contra os fitopatógenos *Colletotrichum abscissum* e *Phyllosticta citricarpa*. A avaliação foi realizada pela adição de 100 µL do extrato obtido sobre uma placa de BDA com auxílio da alça de drigalski e discos de colônias do fitopatógeno foram dispostos no centro da placa. Foi utilizado como controle negativo o fungicida Derosal ® (1,0 mg/mL) e como controle positivo metanol (solvente no qual os extratos foram diluídos). As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 7 dias para *C. abscissum* e 21 dias para *P. citricarpa*. O crescimento em cada tratamento foi avaliado por comparação com os valores obtidos nos controles negativos e solvente (SAVI et al., 2015b; HOKAMA et al. 2016).

4.3.3 Atividade antibacteriana contra patógenos de interesse clínico – Teste de difusão em disco

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizados os patógenos *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina (SASM) (ATCC 25923), *S. aureus*

resistente a Meticilina (SARM)(BACHC-MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Acinetobacter baumannii* (BACHC-ABA), *Klebsiella pneumoniae* produtor da enzima carbapenase (KPC) (BACHC-KPC), *Stenotrophomonas maltophilia* (BACHC-SMA) e *Enterobacter cloacae* produtor da enzima VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase) (BACHC-VIM). As linhagens com o código BACHC foram obtidas do Banco de Cepas usadas no controle de qualidade de meios e testes fenotípicos e moleculares do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPR.

Os patógenos foram inoculados em 7 mL de caldo TSB e incubados a 37°C, 180 rpm por 10 a 12 horas. Após o cultivo foi realizada a diluição de 10^8 UFC/mL baseado na escala McFaland 10^{-5} , inoculado em placa de ágar Mueller-Hinton com auxílio de *swab* de algodão e sobre estas placas foram posicionados discos impregnados de cada extrato. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado disco com antibiótico de ação contra a bactéria testada e como controle positivo o solvente utilizado na diluição do extrato. Após a incubação foi avaliada a formação de halo, comparando o tratamento com os controles (SAVI et al., 2015b e CLSI, 2015).

4.3.4 CIM– Concentração inibitória mínima, CBM– Concentração bactericida mínima e CFM – Concentração fungicida mínima

Após os testes dos extratos contra os patógenos clínicos e fitopatógenos, os extratos que apresentaram melhor atividade foram selecionados para as análises de CIM. O teste realizado com os patógenos clínicos foi baseado na metodologia descrita por Ostrosky et al. (2008), com leitura da absorbância realizada em leitor de Elisa em 490nm. Para o fitopatógeno *P. citricarpa* a metodologia foi baseada na descrita por Tonial et al. (2017).

Para determinação de CBM e CFM, 50 μ L dos cultivos que não apresentaram crescimento a partir da CIM foram inoculados em placa com TSA e BDA, respectivamente, e incubados a 24h para o CBM e 14 dias para o CFM. A ausência completa de crescimento caracterizou a concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF) (SOLTANI; MOGHADDAM, 2014; SANTOS et al. 2015).

4.3.5 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), sendo comparadas as atividades dos extratos em cada condição (meio de cultura e temperatura), baseada na formação de halos de inibição para os patógenos clínicos e inibição de crescimento micelial para os fitopatógenos, com os controles para cada patógeno. Foi realizado posteriormente o teste de *Post-hoc* usando o Tukey's para determinação da diferença significativa, entre os dados analisados. O nível de significância utilizado foi de 0,05(α).

5 RESULTADOS

5.1 COLETA E ISOLAMENTO

A partir de 2988 fragmentos de folhas e pecíolos analisados, 10 actinomicetos foram obtidos (TABELA 1). A frequência de isolamento de actinomicetos foi de 0,34%, sendo 70% (n=7) isolados da região do Abobral e 30% (n=3) da região de São Bento. Cinco isolados foram obtidos de folhas e cinco de pecíolos (TABELA 1).

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO, CÓDIGO DE ACESSO DO GenBank (NCBI), REGIÃO DE COLETA E MATERIAL DE ORIGEM

Isolado	Código	Cód. de acesso GenBank	Região	Material de origem
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB466	KY458125	Abobral	Folha
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB487	KY421547	Abobral	Folha
<i>Aeromicrobium ponti</i> .	LGMB491	KY411896	Abobral	Folha
<i>Microbacterium</i> sp.	LGMB471	KY423334	São Bento	Folha
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB461	KY411900	São Bento	Pecíolo
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB465	KY411898	São Bento	Pecíolo
<i>Micrococcus</i> sp.	LGMB 485	KY423496	Abobral	Folha
<i>Sphaerisporangium</i> sp.	LGMB482	KY458126	Abobral	Pecíolo
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	LGMB483	KY423333	Abobral	Pecíolo
<i>Williamsia serinedens</i>	LGMB479	KY421546	Abobral	Pecíolo

FONTE: O Autor (2017)

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

5.2.1 Caracterização Molecular

Por meio da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com sequências disponíveis no banco de dados GenBank usando a ferramenta Blast, os isolados foram identificados em 8 gêneros: *Actinomadura*, *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Sphaerisporangium*, *Streptomyces* e *Williamsia*. Cada gênero foi analisado separadamente por análise filogenética baseada em inferência bayesiana, matriz de similaridade e sítios informativos.

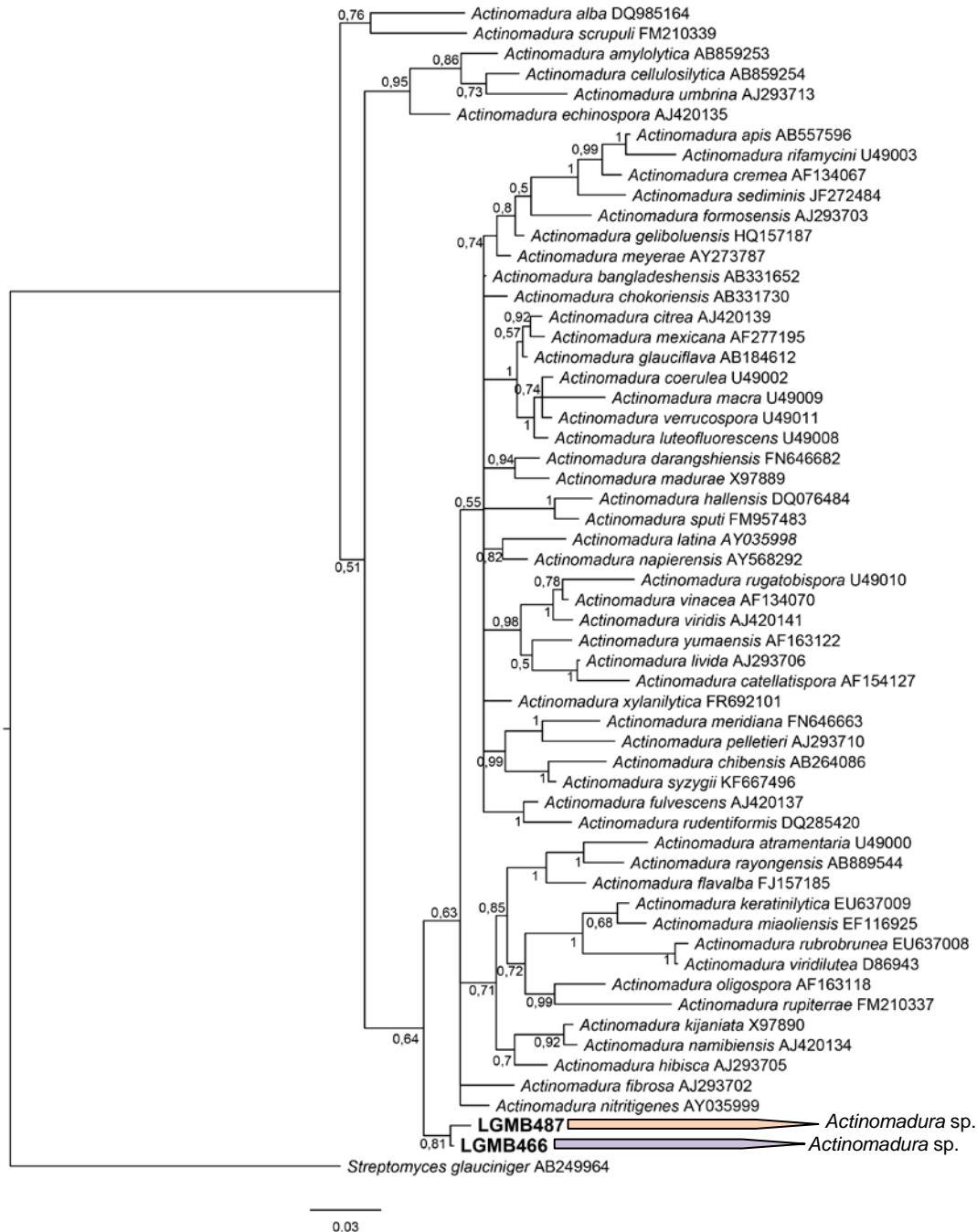
5.2.1.1 Actinomadura (LGMB466 e LGMB487)

As linhagens LGMB466 e LGMB487 caracterizadas como pertencentes ao gênero *Actinomadura*, foram alinhadas com as sequências das linhagens tipo deste gênero. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Streptomyces glauciniger* (AB249964) (FIGURA 4). O alinhamento consistiu de 1402 caracteres, destes, 124 foram informativos, 1011 conservados e 131 não informativos. Entre os isolados LGMB466 e LGMB487 o percentual de similaridade foi de 98,86% (ANEXO 1). As linhagens LGMB466 e LGMB487 estão posicionadas em um ramo separado das demais espécies com alto suporte de probabilidade a posteriori, e outras análises são necessárias para a identificação e descrição das espécies como MLSA e DNA-DNA hibridização (FIGURA 4).

5.2.1.2 Aeromicrobium (LGMB491)

A linhagem LGMB491 foi caracterizada como pertencente ao gênero *Aeromicrobium* e foi alinhada com as linhagens tipo do gênero e a linhagem *Nocardioides albus* (X53211) utilizada como grupo externo. O alinhamento consistiu em 1336 caracteres, sendo 89 informativos, 1164 conservados e 68 não informativos. Na árvore filogenética (FIGURA 5) a linhagem LGMB491 foi agrupada com a espécie *A. ponti* (AM778683), apresentando 99,25% de similaridade (ANEXO 2) e alto suporte de probabilidade a posteriori (1,0). Desta forma, a linhagem LGMB491 foi identificada como *Aeromicrobium ponti*.

FIGURA 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS LGMB466 E LGMB487 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Actinomadura*.



NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores suporte de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Streptomyces glauciniger*. O valor de 0.03 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

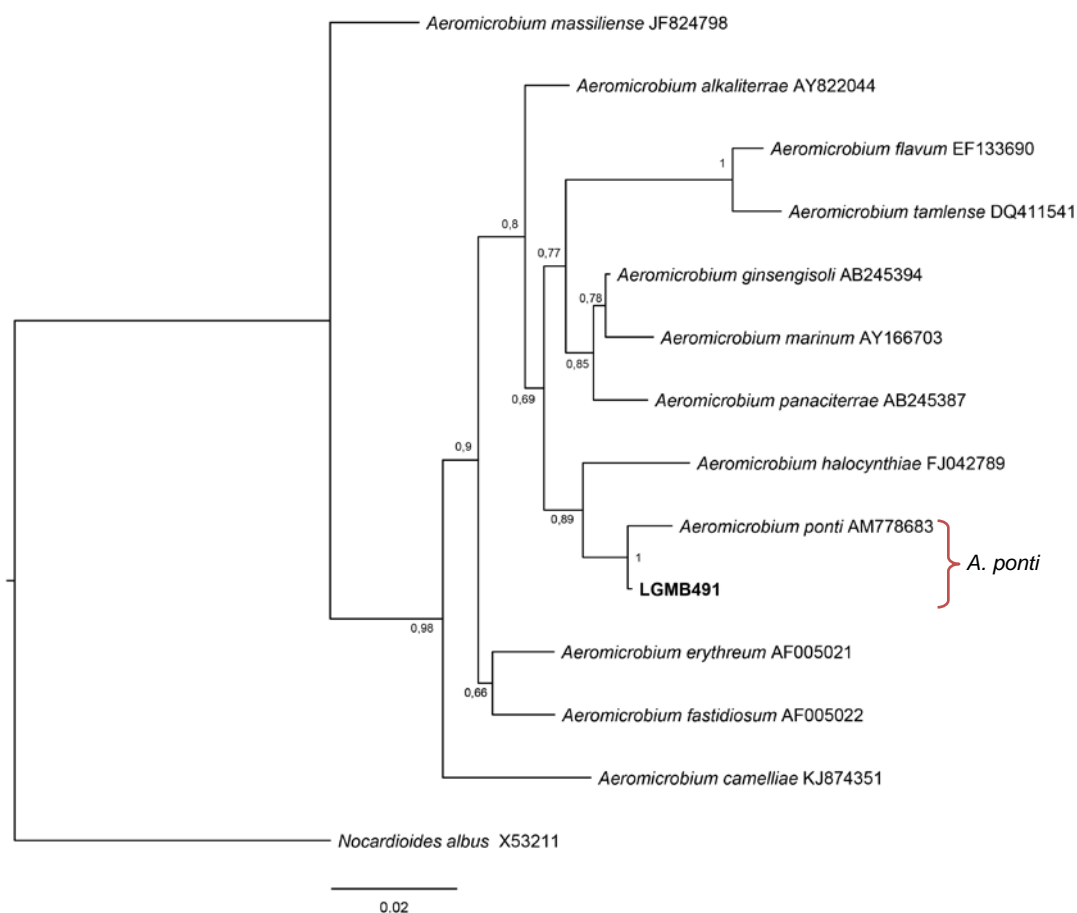
5.2.1.3 *Microbacterium* (LGMB471)

Para a análise filogenética a linhagem LGMB471 (*Microbacterium*) foi alinhada com as linhagens tipo do gênero, sendo utilizada a linhagem *Agrococcus jenensis* (X92492) como grupo externo para o enraizamento da árvore. O alinhamento consistiu em 1314 caracteres, com 122 informativos, 721 conservados e 57 não informativos. A sequência da linhagem LGMB471 foi agrupada próximo a outras 6 espécies, compartilhando similaridade de 98,66% (ANEXO 3) com *M. liquefaciens* (X77444), 99,07% com *M. maritopicum* (AJ853910), 98,97% com *M. oxydans* (Y17227), 97,63% com *M. luteolum* (AB004718), 97,94% com *M. saperdae* (AB004719) e 98,87% com *M. paraoxydans* (AJ491806). Entretanto, LGMB471 está localizada em um ramo separado com 0,69 de suporte de probabilidade a posteriori (FIGURA 6).

5.2.1.4 *Microbispora* (LGMB461 e LGMB465)

Para a análise das linhagens LGMB461 e LGMB465 (*Microbispora*), foi utilizada a sequência parcial do gene 16S rRNA, alinhada com sequências dos genes 16S rRNA, *gyrB* e *rpoB* de linhagens tipo do gênero e das linhagens previamente identificadas por Savi et al. (2016), *Microbispora* sp.1 (LGMB251, LGMB259), *Microbispora* sp.2 (LGMB258) e *Microbispora* sp.3 (LGMB252, LGMB253, LGMB260, LGMB261), a linhagem *Actinomadura echinospora* utilizada como grupo externo enraizando a árvore (FIGURA 7). O alinhamento consistiu de 1365 caracteres, sendo 33 informativos, 543 conservados, 35 não informativos. As linhagens LGMB461 e LGMB465 apresentaram similaridade de 99,84% e 100%, respectivamente, com *Microbispora* sp.1 (LGMB259) (SAVI et al. 2016) (ANEXO 4)

FIGURA 5- ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB491 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Aeromicrobium*.



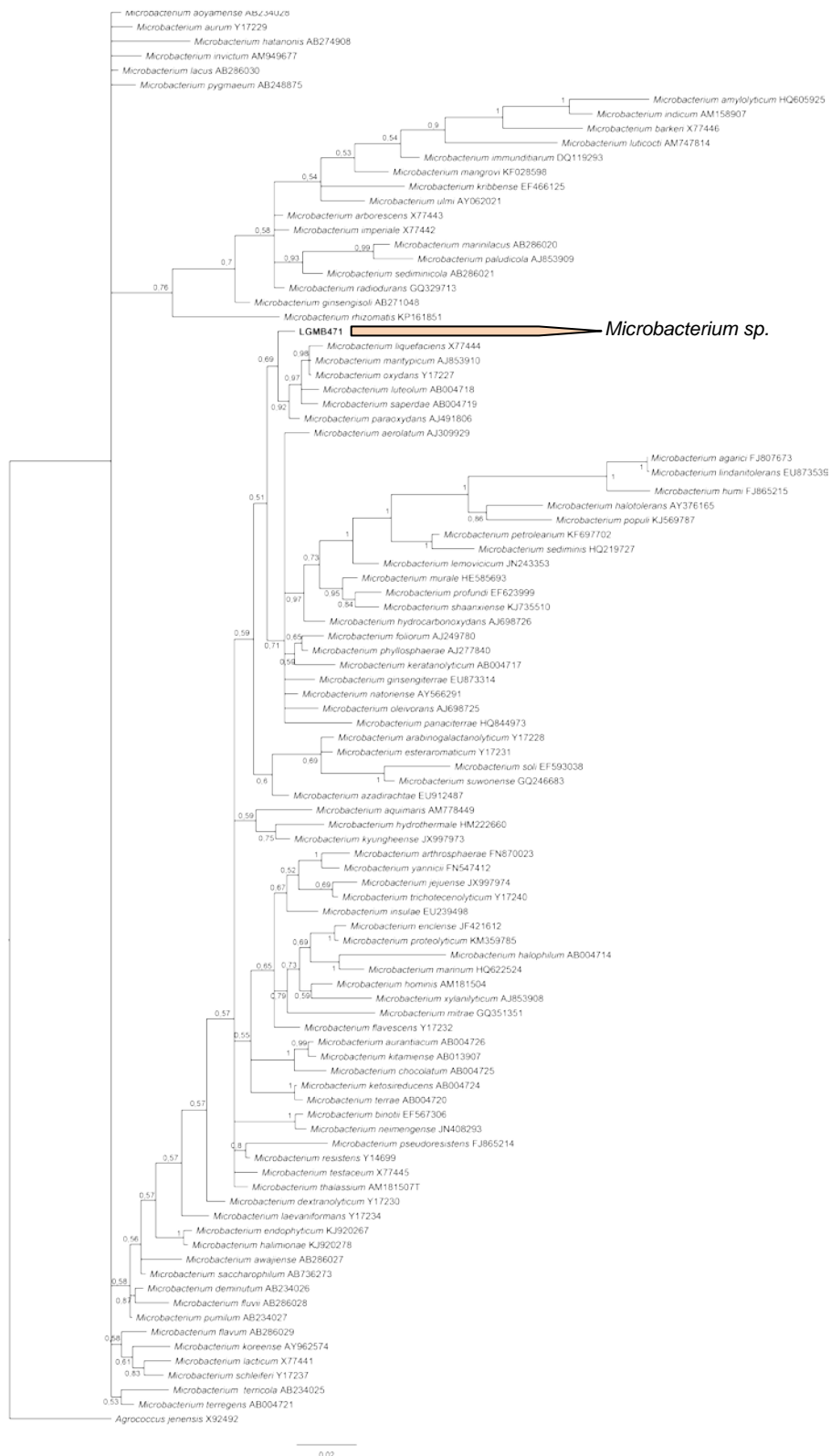
NOTA: Números a esquadados nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Nocardioideus albus*. O valor de 0.02 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

5.2.1.5 *Micrococcus* (LGMB485)

A linhagem LGMB485 foi alinhada com sequências de todas as linhagens tipo do gênero *Micrococcus* e a árvore foi enraizada com o grupo externo *Citricoccus parietalis* (FIGURA 8). O alinhamento consistiu de 1340 caracteres, com 9 informativos, 452 conservados e 19 não informativos. Os valores de similaridade entre as sequências estão entre 97,92% e 100% (ANEXO 5). A sequência parcial do gene 16S rRNA analisada não gerou informações suficientes para que fosse determinada a espécie da linhagem LGMB485, sendo denominada de *Micrococcus* sp.

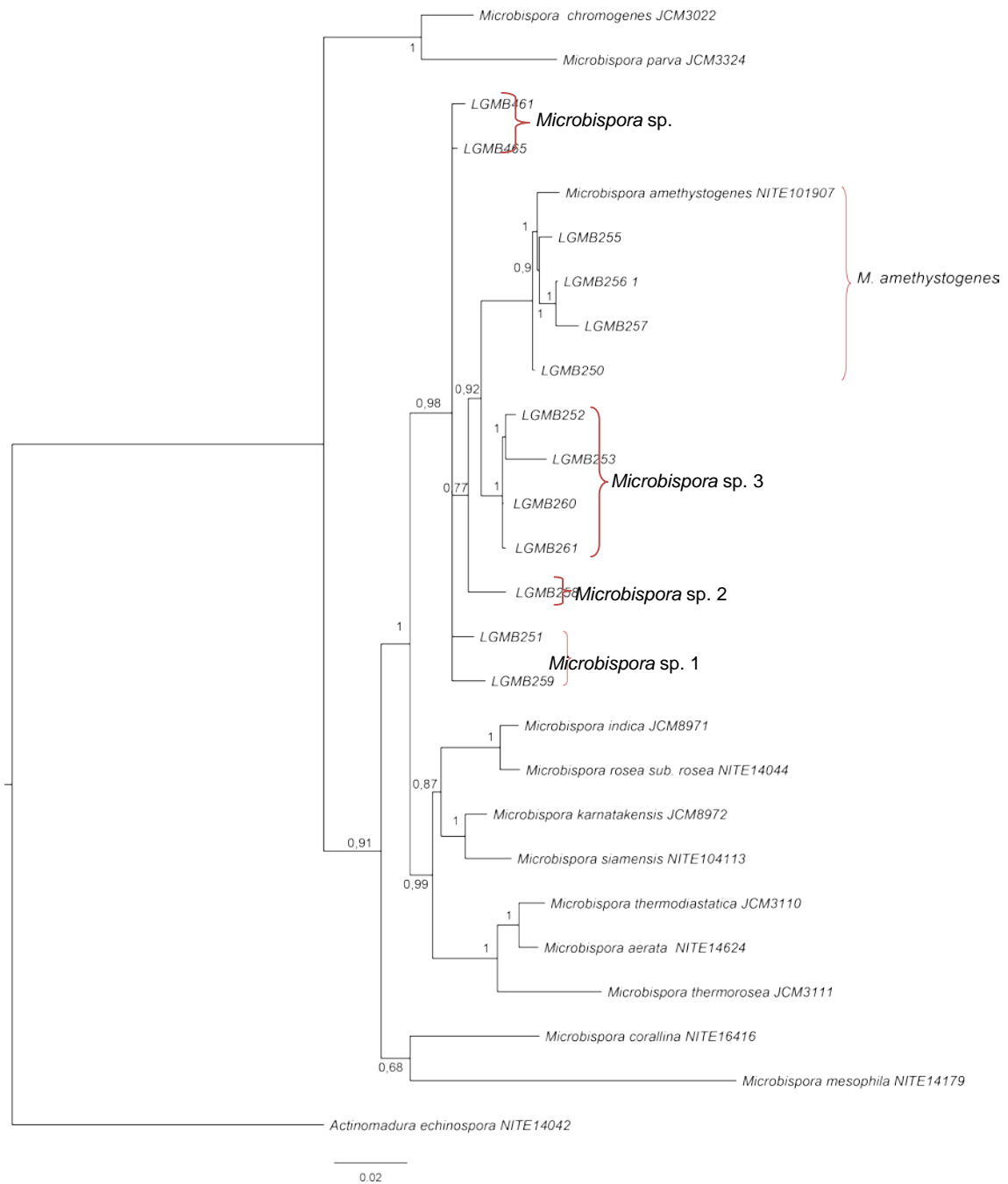
FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB471 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Microbacterium*.



NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Agrococcus jenensis*. O valor de 0.02 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

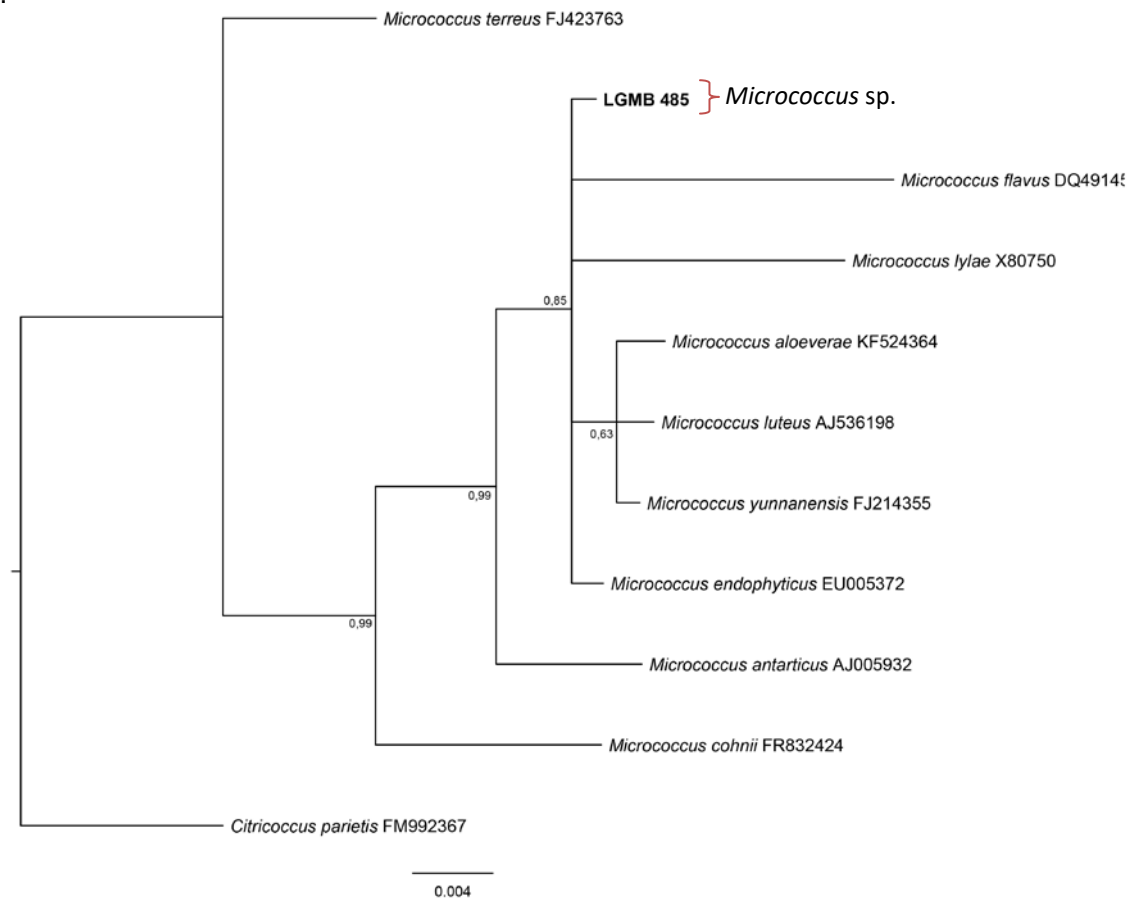
FIGURA 7 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS LGMB461 E LGMB465 E 16S rRNA, *gyrB* e *rpoB* PARA TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Microbispora*



NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Actinomadura echinospora*. O valor de 0.02 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB485 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Micrococcus*



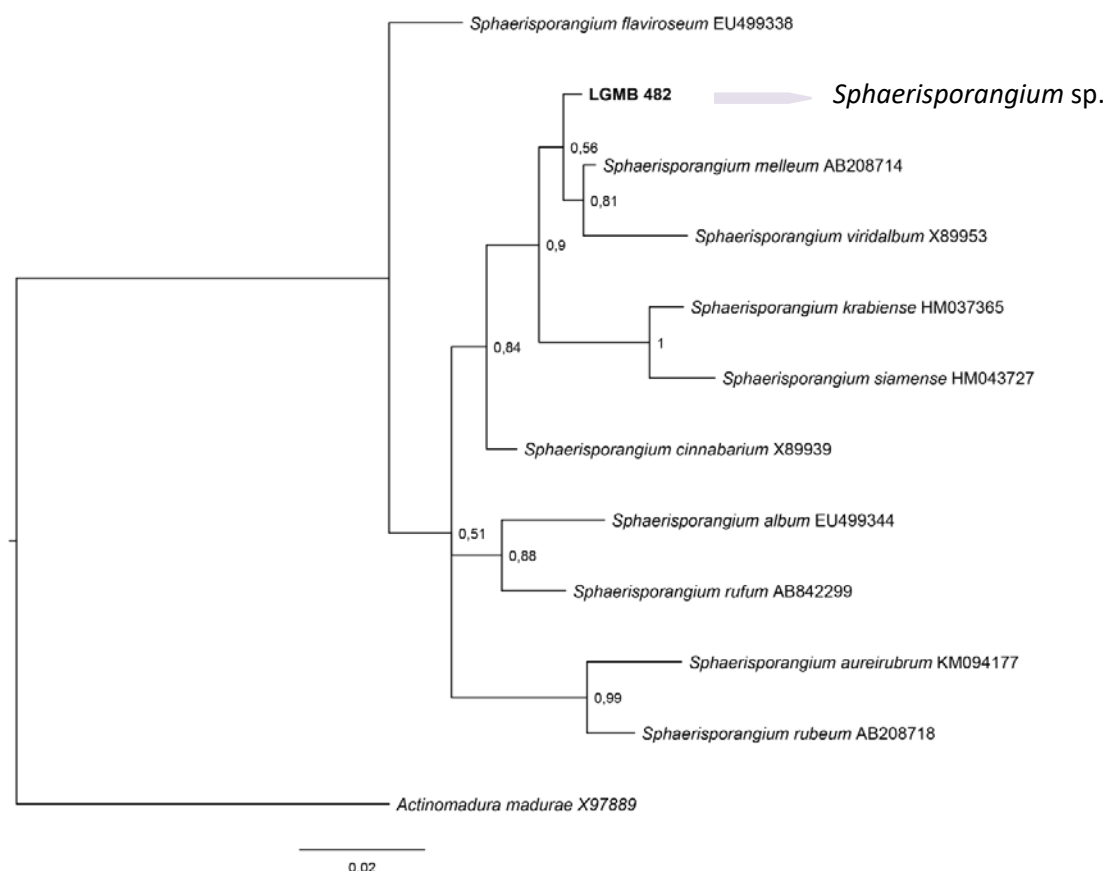
NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Citricoccus parietis*. O valor de 0.004 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

5.2.1.6 *Sphaerisorangium* (LGMB482)

A linhagem LGMB482, foi alinhada com linhagens tipo do gênero *Sphaerisorangium* e *Actinomadura madurae* como grupo externo (FIGURA 9). O alinhamento consistiu em 1320 caracteres, sendo 51 informativos, 886 conservados e 47 não informativos. Na análise da árvore filogenética (FIGURA 9), a linhagem LGMB482 no mesmo clado que as espécies *S. melleum* e *S. viridalbum*, porém está localizada em um ramo separado e com suporte de 0,56 de probabilidade a posteriori. A similaridade da linhagem LGMB482 quando comparado com *S. melleum* foi de 99,4%, para *S. viridalbum* foi de 97,89% e para a espécie *S. cinnabarium* de 98,89% (ANEXO 6). Baseado na análise filogenética e matriz de similaridade, mais estudo são necessário para a identificação da linhagem.

FIGURA 9 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB482 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Sphaerisorangium*.



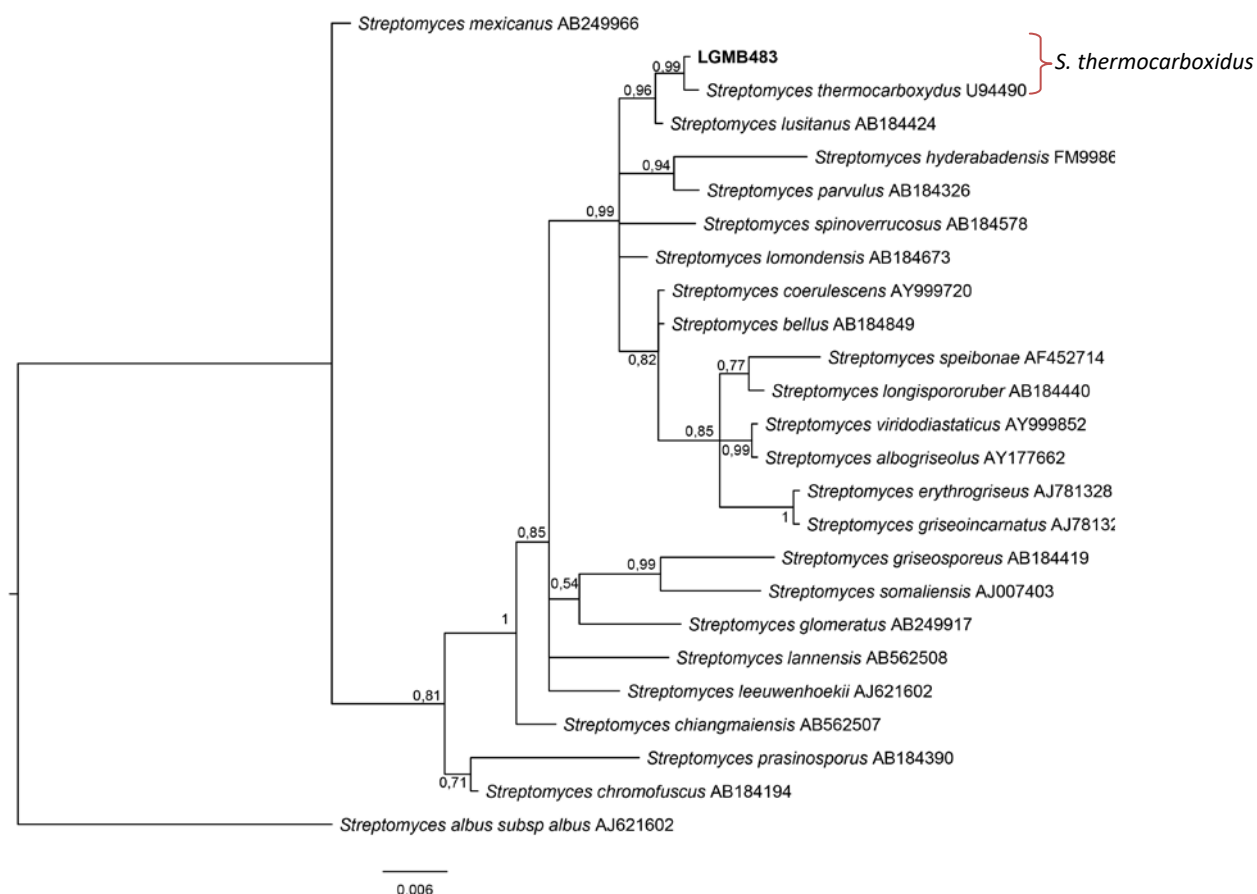
NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Actinomadura madurae*. O valor de 0.02 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

5.2.1.7 *Streptomyces* (LGMB483)

O gênero *Streptomyces* possui mais de 500 espécies, e portanto, para as análises foram selecionadas sequências de 23 espécies próximas da linhagem LGMB483, baseado nas linhagens utilizada por Busarakam et al. (2014). A árvore filogenética foi enraizada com o grupo externo *Streptomyces albus* subsp. *albus* (X53163). O alinhamento consistiu em 1391 caracteres, sendo 45 informativos, 1291 conservados e 39 não conservados. A linhagem LGMB483 agrupou com a espécie *Streptomyces thermocarboxydus* (U94490), com suporte de 0.99 (FIGURA 10) e similaridade de 99.86% (ANEXO 7). Desta forma a linhagem LGMB483 foi identificada como *S. thermocarboxydus*.

FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB483 E 23 LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Streptomyces*.



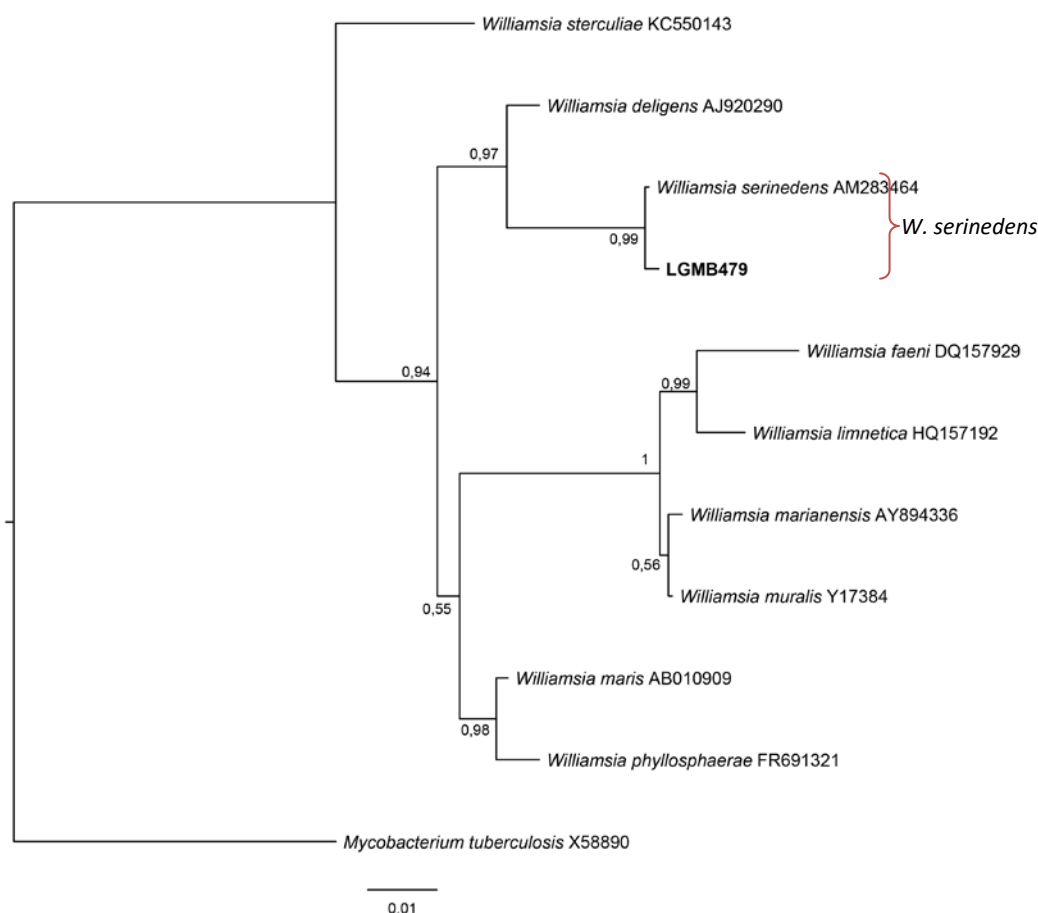
NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Streptomyces albus* subsp. *albus*. O valor de 0.006 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

5.2.1.8 *Williamsia* (LGMB479)

A linhagem LGMB479 pertencente ao gênero *Williamsia* foi alinhada com as sequências das linhagens tipo das espécies do gênero, e a árvore filogenética foi enraizada com o grupo externo *Mycobacterium tuberculosis* (X58890) (FIGURA 11). O alinhamento consistiu de 1346 caracteres, sendo 81 informativos, 1185 conservados e 56 não informativos. A linhagem LGMB479 agrupou com a espécie *Williamsia serinedens* (AM283464), com probabilidade a posteriori de 0,99 e similaridade de 99,85% (ANEXO 8). Desta forma, a linhagem LGMB479 foi identificada como *W. serinedens*.

FIGURA 11 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA DO ISOLADO LGMB479 E TODAS AS LINHAGENS TIPO DO GÊNERO *Williamsia*.



NOTA: Números a esquerda dos nós indicam valores de probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com o grupo externo *Mycobacterium tuberculosis*. O valor de 0.01 indica as substituições por nucleotídeos.

FONTE: O Autor (2017)

5.2.2. Caracterização morfológica

Na análise morfológica os isolados apresentaram grande diversidade, o que era esperado pelo fato de pertencerem a gêneros e espécies diferentes. As colônias demonstraram diversas colorações como branco, creme, rosa, marrom, cinza, vermelho, laranja e amarelo. Seis isolados mostraram abundante a moderada formação de esporos nos meios ISP2 e ISP3 (TABELA 3 E FIGURA 12). Os isolados de *Microbispora* sp. (LGMB461 e LGMB465) apresentaram alta similaridade morfológica, apresentando diferença no meio de cultura ISP5 em relação a produção de esporos e coloração do micélio.

Nas análises de microcultivo, seis linhagens (LGMB466, LGMB487, LGMB461, LGMB465, LGMB482 e LGMB483) apresentaram formação de hifas e conídios característicos de actinomicetos e quatro linhagens (LGMB471, LGMB479, LGMB485 e LGMB491) apresentaram células em forma de bacilos sem a formação de conídios. As linhagens LGMB466 e LGMB487 apresentaram cadeias curtas de conídios características do gênero *Actinomadura*. As linhagens LGMB461 e LGMB465 apresentaram conídios em pares característicos do gênero *Microbispora*. A linhagem LGMB482 demonstrou a presença de hifas e conídios características do gênero *Sphaerisporangium* e a linhagem LGMB483 apresentou longas cadeias de conídios características do gênero *Streptomyces*. A classificação foi realizada seguindo critérios para identificação de actinomicetos descritos em *Bergey's Manual of determinative Bacteriology* (HOLT et. al.,1994). As linhagens LGMB491, LGMB471, LGMB485 e LGMB479 apresentaram células em forma de bacilos, características dos gêneros *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Williamsia*, respectivamente

TABELA 2 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS, 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO NOS MEIOS DE CULTURA
ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 A 28°C.

Isolados	ISP2 - Ágar extrato de levedura-malte			ISP3 - Agar Aveia			ISP4 - Agar Amido e sais inorgânicos			ISP5 - Agar Glicerol Asparagina		
	Esporos	Substrato micelial	Crescimento	Esporos	Substrato micelial	Crescimento	Esporos	Substrato micelial	Crescimento	Esporos	Substrato micelial	Crescimento
<i>Actinomadura</i> sp. LGMB466	Moderado: Branco	Marrom	+++	Abundante: Branco	Amarelo	+++	Baixo: Branco	Amarelo	+++	Baixo: Branco	Rosa	+++
<i>Actinomadura</i> sp. LGMB487	Moderado: Branco	Bege	++	Abundante: Branco	Amarelo	++	Baixo: Branco	Amarelo	+++	Baixo: Branco	Bege	+++
<i>Aeromicrobium ponti</i> LGMB491	-	Amarelo	+	-	Amarelo	++	-	Amarelo	++	-	Amarelo	++
<i>Microbacterium</i> sp. LGMB471	-	Amarelo	+++	-	Amarelo	+++	-	Bege	++	-	Bege	+++
<i>Microbispora</i> sp. LGMB461	Abundante: Branco	Bege	+++	Abundante: Branco	Bege	+++	Abundante: Branco	Bege	+	Abundante: Branco	Branco	+++
<i>Microbispora</i> sp. LGMB465	Moderado: Branco	Bege	+++	Abundante: Branco	Bege	+++	Abundante: Branco	Bege	+	Abundante: Branco	Bege	++
<i>Micrococcus</i> sp. LGMB485	-	Branco	+++	-	Branco	+++	-	Branco	+++	-	Branco	+++
<i>Sphaerisporangium</i> sp LGMB482	Abundante: Branco	Marrom	+++	Abundante: Branco	Rosa	+++	Abundante: Rosa	Vermelho/ Bege	+++	Abundante: Branco	Bege	++
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> LGMB483	Abundante: Cinza	Cinza	+++	Moderado: Branco	Bege	+++	Abundante: Branco	Cinza	+++	Abundante: Branco	Marrom	+++
<i>Williamsia serinedens</i> LGMB479	-	Laranja	+++	-	Laranja	+++	-	Laranja	+++	-	Laranja	+++

Nota: - Nenhum, + Baixo, ++ Moderado, +++ Abundante

FONTE: O Autor (2017)

FIGURA 12- ANÁLISE MACRO MORFOLÓGICA DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS, 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO NOS MEIOS DE CULTURA ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 A 28°C



FONTE: O Autor (2017)

5.2.3 Teste de Sensibilidade dos actinomicetos a antibióticos

Os perfis de susceptibilidade das linhagens frente a 11 antibióticos foram determinados utilizando o método de disco difusão (TABELA 2). Desta forma, 80% dos isolados foram sensíveis à Vancomicina, 90% sensíveis a Estreptomicina, 70% sensíveis a Tetraciclina e 80% sensíveis a Gentamicina.

Todos os isolados foram resistentes ou intermediários aos antibióticos Cloranfenicol e Ampicilina, 90% apresentaram resistência a Oxacilina e 80% apresentaram resistência ao ácido nalidixico. Somente os dois isolados de *Microbispora* sp. (LGMB461 e LGMB465) apresentaram resistência ao Meropenem, enquanto, todos os outros apresentaram sensibilidade (TABELA 2).

TABELA 3 - ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS ACTINOMICETOS ISOLADOS A 11 ANTIBIÓTICOS

ISOLADOS	ANTIBIÓTICOS										
	Oxa 1µg	Van 30µg	Clo 30µg	Mer 10µg	Est 10µg	Tet 30µg	Gen 10µg	Rif 5µg	Amp 10µg	Caz 30µg	Nal 30µg
<i>Actinomadura</i> sp. LGMB466	R	S	I	S	S	S	S	I	R	R	R
<i>Actinomadura</i> sp. LGMB487	S	I	R	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Aeromicrobium ponti</i> LGMB491	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>Microbacterium</i> sp. LGMB471	R	S	I	S	S	S	S	I	R	R	R
<i>Microbispora</i> sp. LGMB461	R	S	R	R	S	S	S	I	R	R	R
<i>Microbispora</i> sp. LGMB465	R	S	R	R	S	S	I	I	R	R	R
<i>Micrococcus</i> sp. LGMB485	R	I	R	S	I	I	I	I	R	S	R
<i>Sphaerisporangium</i> sp LGMB482	R	S	I	S	S	S	S	I	R	R	R
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> . LGMB483	R	S	R	S	S	I	S	R	R	R	R
<i>Williamsia serinedens</i> . LGMB479	R	S	R	S	S	I	S	I	I	S	R

NOTA: Oxacilina (Oxa), Vancomicina (Van), Cloranfenicol (Clo), Meropenem (Mer), Estreptomicina (Est), Tetraciclina (Tet), Gentamicina (Gen), Rifampicina (Rif), Ampicilina (Amp), Ceftazidima (Caz) e Ácido nalidixico (Nal). (S) Sensível >20mm; (I) intermediário 10–19.9mm; (R) resistente 0.0–9.9mm.

FONTE: O Autor (2017)

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.4.1 Produção de extratos

Um total de 40 extratos foram produzidos a partir dos 10 isolados nos meios SG e R5A, a 28°C e 36°C. Quanto ao rendimento dos extratos produzidos, no meio SG 70% dos extratos apresentaram maior rendimento em 36°C, e 30% a 28°C. Para o meio R5A, o rendimento foi de 50% para cada uma das temperaturas (TABELA 4).

TABELA 4 - PESOS SECOS OBTIDOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS NOS MEIOS SG E R5A NAS TEMPERATURAS 28°C E 36°C

Isolados	Códigos	SG		R5A	
		28°C	36°C	28°C	36°C
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB466	12mg	13mg	17mg	65mg
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB487	29mg	151mg	21mg	86mg
<i>Aeromicrobium ponti</i>	LGMB491	10mg	63mg	71mg	174mg
<i>Microbacterium</i> sp.	LGMB471	11mg	25mg	12mg	17mg
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB461	326mg	9mg	43mg	11mg
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB465	17mg	48mg	19mg	13mg
<i>Micrococcus</i> sp.	LGMB485	8mg	16mg	146mg	41mg
<i>Sphaerisporangium</i> sp	LGMB482	12mg	14mg	16mg	20mg
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	LGMB483	130mg	4mg	92mg	199mg
<i>Williamsia serinedens</i>	LGMB479	139mg	11mg	9mg	8mg

FONTE: O Autor (2017)

5.4.2 Atividade dos extratos contra fitopatógenos

Todos os extratos (n=40) foram testados contra os fitopatógenos *C. abscissum* e *P. citricarpa*, sendo que 18 apresentaram inibição do crescimento micelial superior a 50% de pelo menos um dos fitopatógenos (TABELA 5, FIGURA 13 E 14).

Os extratos produzidos pela linhagem LGMB471 (*Microbacterium* sp.) inibiram mais de 80% o crescimento micelial de

P. citricarpa. Os maiores percentuais de inibição foram obtidos no cultivo em caldo SG, a 36°C, com inibição de 100% do crescimento micelial do fungo de *P. citricarpa* (FIGURA 17) e 50,91% do crescimento micelial do fungo *C. abscissum*. Desta forma, este extrato foi selecionado para os testes de Concentração Inibitória Mínima - CIM e Concentração fungicida Mínima – CFM contra *P. citricarpa*. O teste não foi realizado para *C. abscissum*, pois houve crescimento parcial na concentração de 10mg/mL do extrato, não sendo possível então determinar a CIM do extrato frente a este fitopatógeno. O valor de 0,16mg/mL foi obtido tanto como CIM quanto CFM para o fungo *P. citricarpa*.

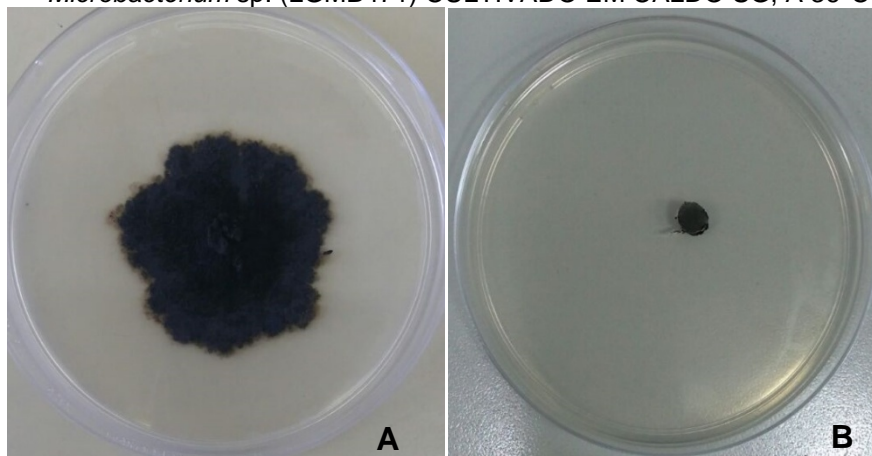
TABELA 5 – INIBIÇÃO EM PORCENTAGEM DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS FITOPATÓGENOS *Colletotrichum abscissum* E *Phyllosticta citricarpa* POR EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A.

Identificação	Inibição do crescimento micelial (%)							
	<i>Colletotrichum abscissum</i>				<i>Phyllosticta citricarpa</i>			
	Meio SG		MeioR5A		Meio SG		MeioR5A	
	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C
<i>Actinoadura</i> sp. LGMB466	34,2	47,3	22,5	7,6	15,06	25,30	13,86	13,25
<i>Actinoadura</i> sp. LGMB487	10,9	8,4	11,6	8,4	62,0	31,3	31,3	67,5
<i>Aeromicrobium ponti</i> . LGMB491	8,0	7,3	16,7	7,6	31,3	27,1	57,2	18,7
<i>Microbacterium</i> sp. LGMB471	47,3	50,9	35,3	46,2	81,3	100,00	92,8	88,0
<i>Microbispora</i> sp. LGMB461	0,4	8,4	5,5	7,6	42,2	21,1	48,8	18,7
<i>Microbispora</i> sp. LGMB465	17,8	13,5	21,5	11,3	12,7	34,3	35,5	30,13
<i>Micrococcus</i> sp. LGMB485	31,3	46,2	47,3	48,7	59,0	58,4	57,2	44,0
<i>Sphaerisorangium</i> sp. LGMB482	50,9	50,5	50,2	47,3	29,5	15,7	36,1	42,2
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> LGMB483	35,6	51,6	46,2	45,8	36,1	30,7	60,2	21,1
<i>Williamsia serinedens</i> LGMB479	49,5	50,2	49,1	49,1	50,6	50,0	47,6	54,8

NOTA: Os valores superiores a 50% estão destacados em negrito e sublinhado. A linhagem LGMB471 que apresentou os melhores resultados também está sublinhada.

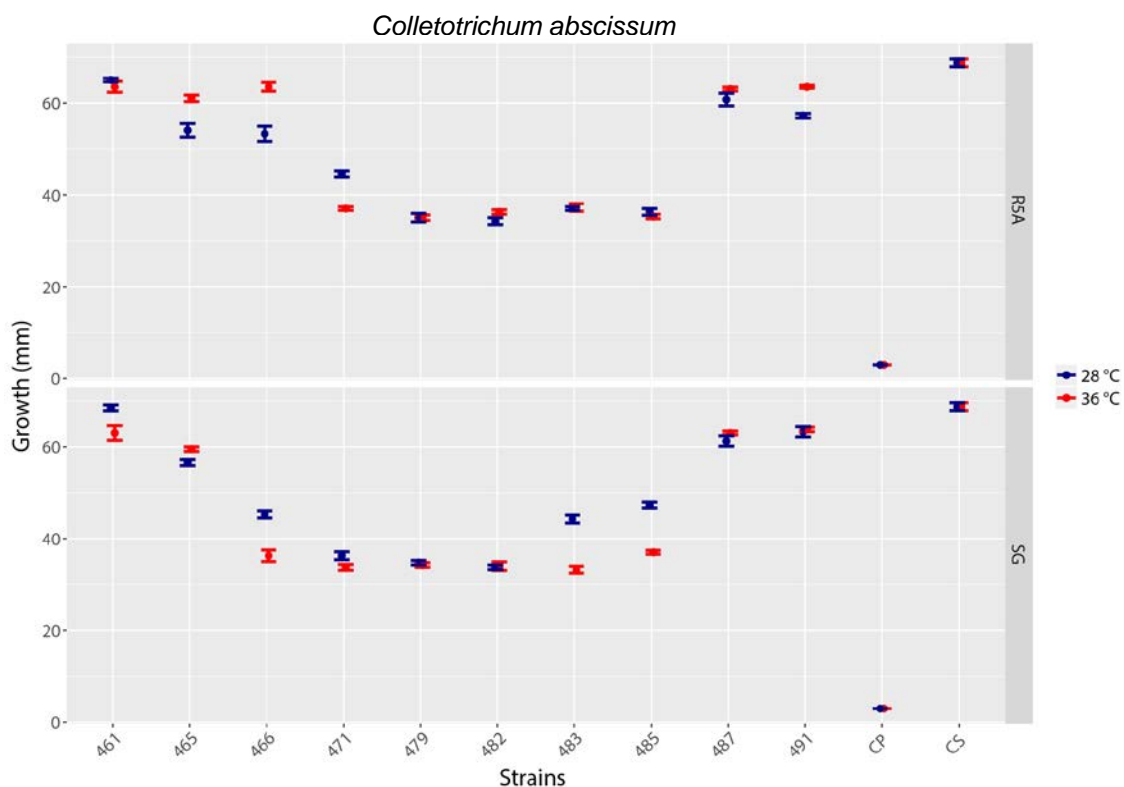
FONTE: O Autor (2017)

FIGURA 13- CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO BDA A 28°C, NA AUSÊNCIA (A) E PRESENÇA (B) DO EXTRATO PRODUZIDO PELO ACTINOMICETO *Microbacterium* sp. (LGMB471) CULTIVADO EM CALDO SG, A 36°C



FONTE: O Autor (2017)

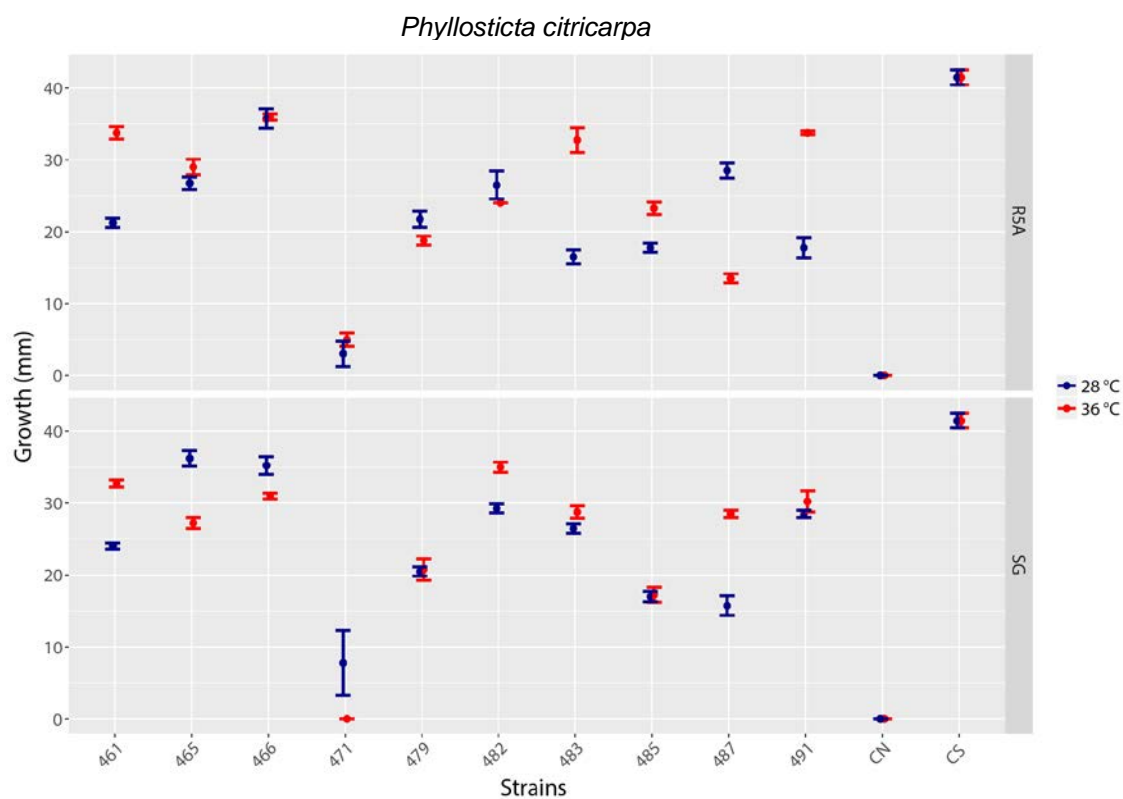
FIGURA 14- ZONA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MILIMETROS (mm) DO FITOPATÓGENO *Colletotrichum abscissum* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS A 28°C E 36°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A



NOTA: Controle negativo Derosal (CN), Controle do solvente com Metanol (CS).

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

FIGURA 15- ZONA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MILIMETROS mm DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 28°C E 36°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A



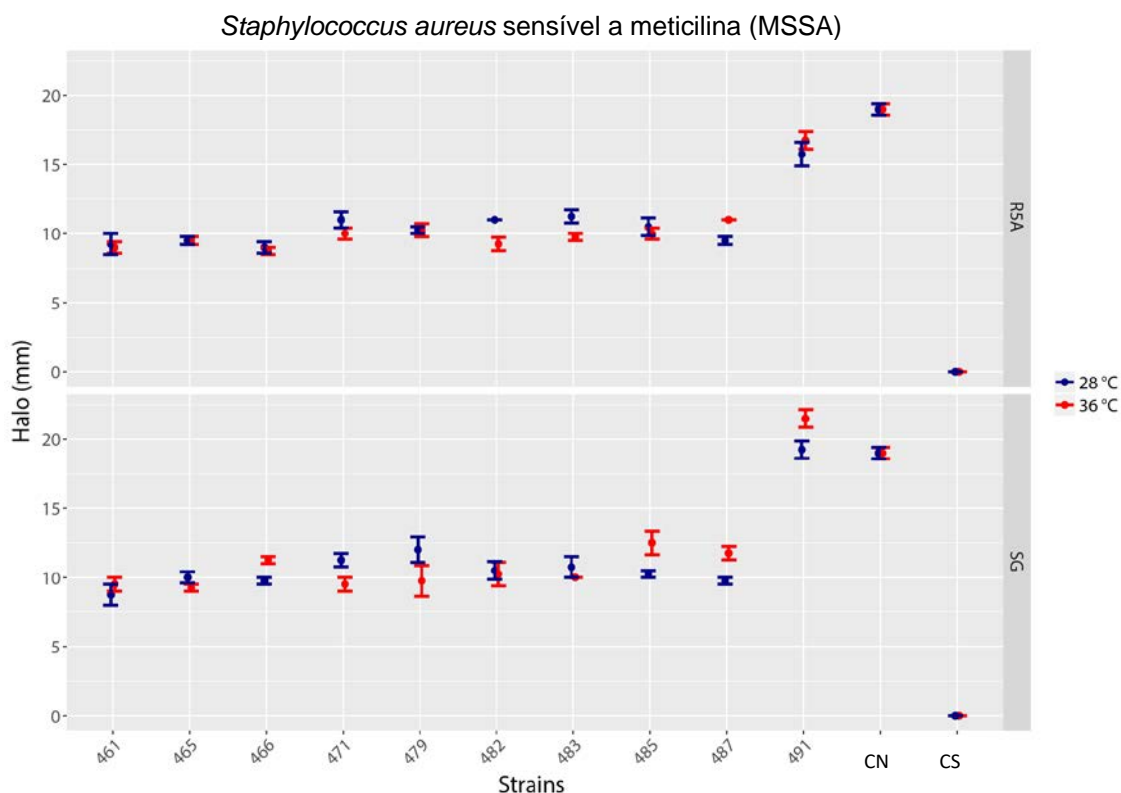
NOTA: Controle negativo Derosal (CN), Controle do solvente com Metanol (CS).

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

5.4.3 Atividade antibacteriana contra patógenos clínicos

Todos os extratos (n=40) apresentaram atividade antibacteriana contra os patógenos clínicos avaliados (ANEXO 9). Para a bactéria *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com o extrato a partir da linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) cultivado em caldo SG a 36°C (FIGURA 16)

FIGURA 16 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Staphylococcus aureus* SENSÍVEL A METICILINA (MSSA) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

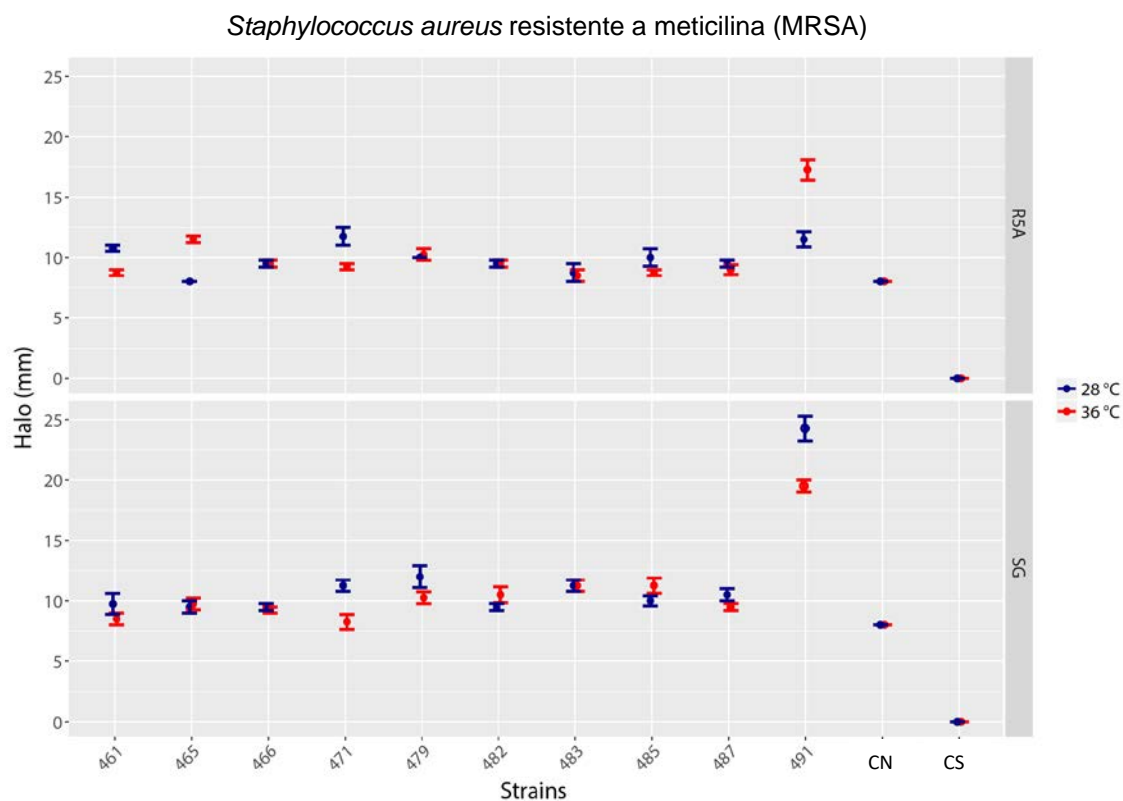


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Oxacilina 1µg/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) os maiores valores do halo de inibição foram obtidos com o extrato produzido a partir da linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) em caldo SG (FIGURA 17).

FIGURA 17 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

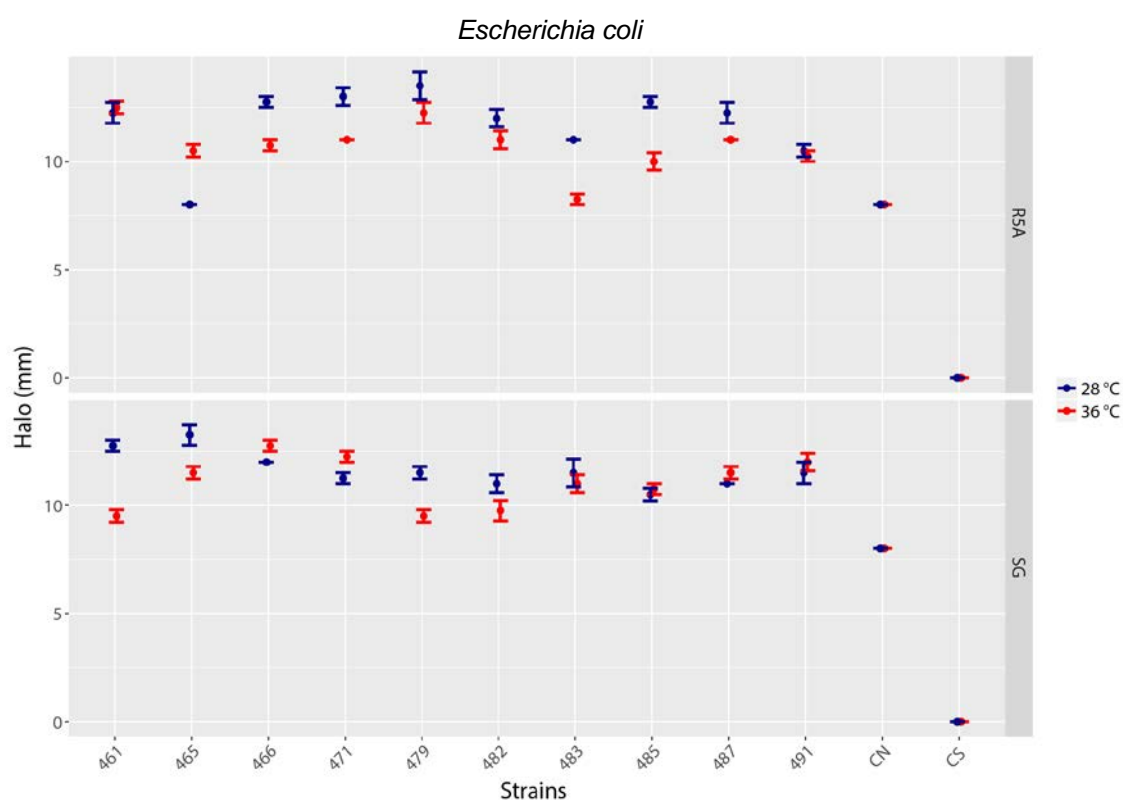


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Oxacilina 6 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Escherichia coli* os maiores halos de inibição foram obtidos com o extrato a partir da linhagem LGMB471 (*Microbacterium* sp.) e 479 (*Williamsia serinedens*) cultivado sem caldo R5A e LGMB465 (*Microbispora* sp.) em caldo SG (FIGURA 18).

FIGURA 18 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Escherichia coli* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

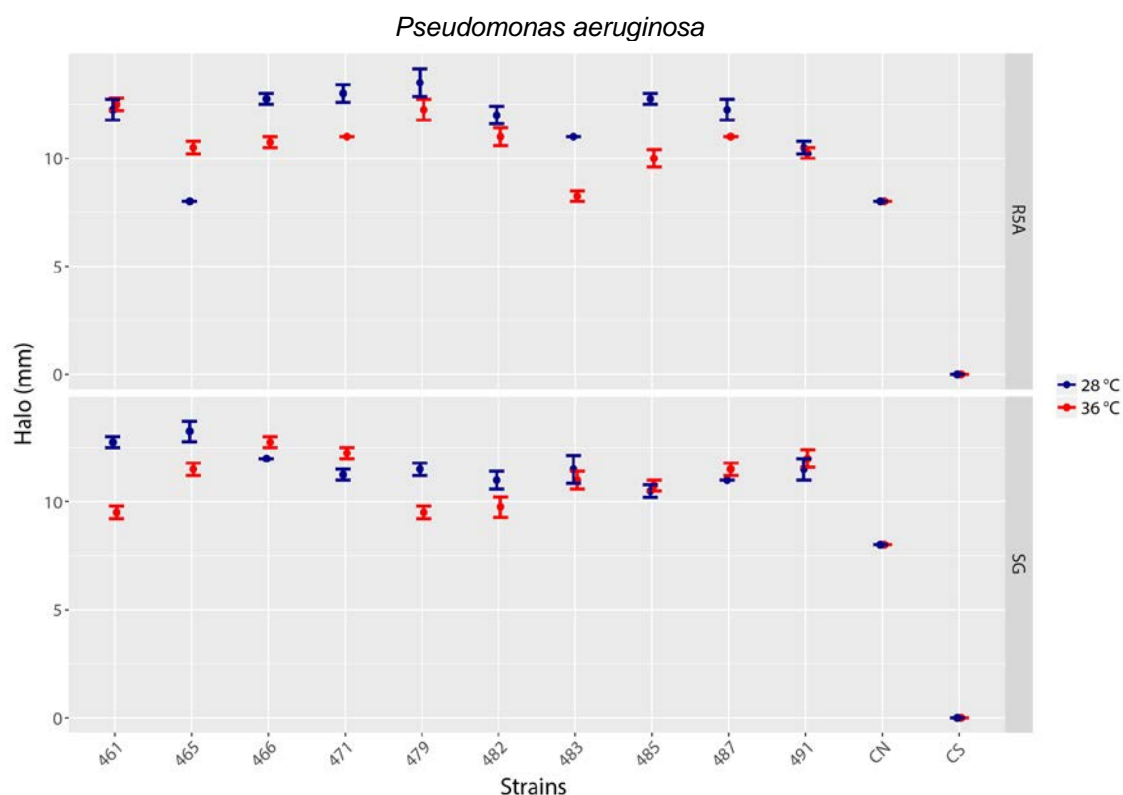


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Ampicilina 10 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* os maiores halos de inibição foram obtidos com o extrato a partir da linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) cultivado em caldo R5A e a 36°C (FIGURA 19).

FIGURA 19 - ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Pseudomonas aeruginosa* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

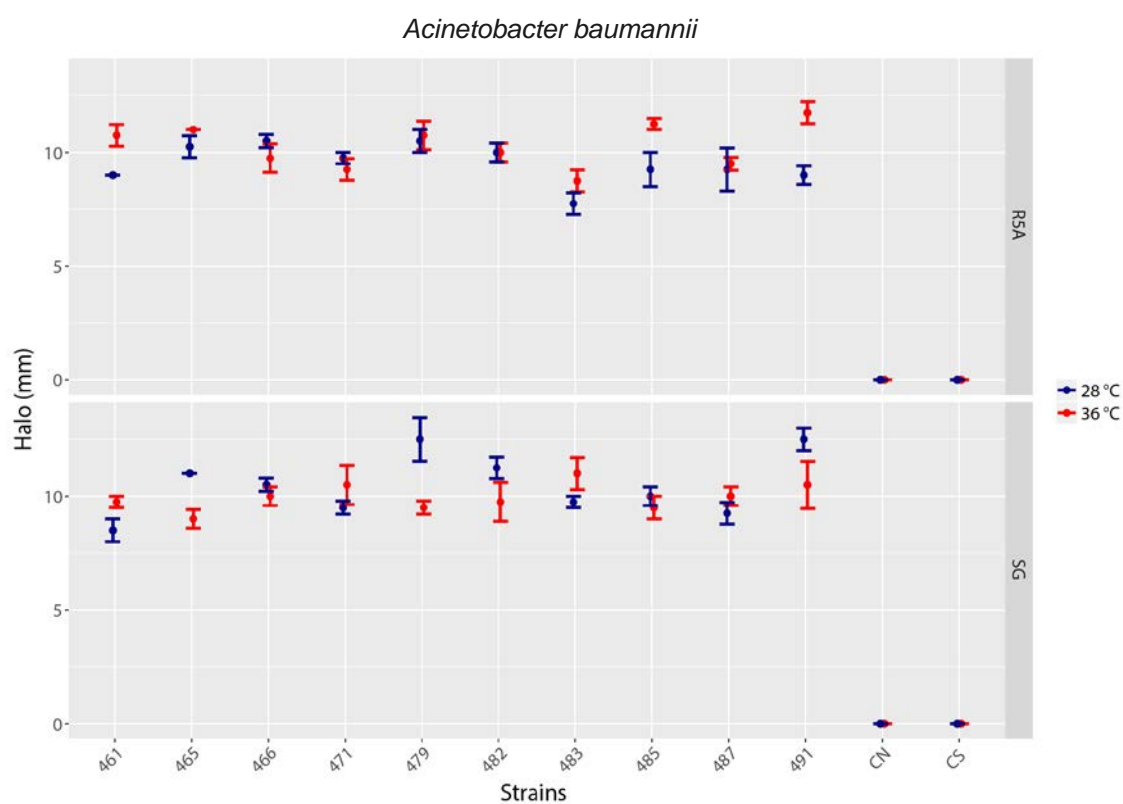


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Meropenem 10 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Acinetobacter baumannii* os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com os extratos a partir das linhagens LGMB479 (*Williamsia serinedens*) e LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) ambos cultivados em caldo SG a 28°C (FIGURA 20).

FIGURA 20- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Acinetobacter baumannii* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

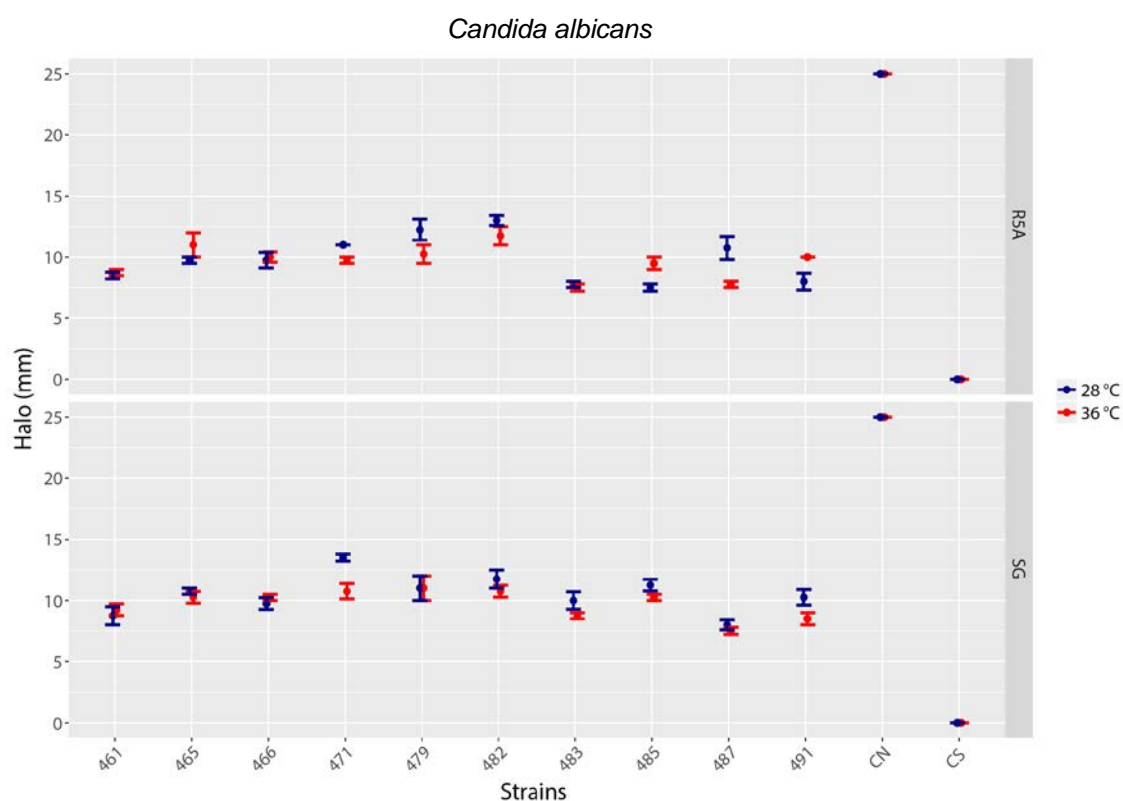


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Vancomicina 30 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a levedura *Candida albicans* os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com o extrato a partir da linhagem LGMB471 (*Microbacterium* sp) cultivado em caldo SG a 28°C (FIGURA 21).

FIGURA 21- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Candida albicans* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTNOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

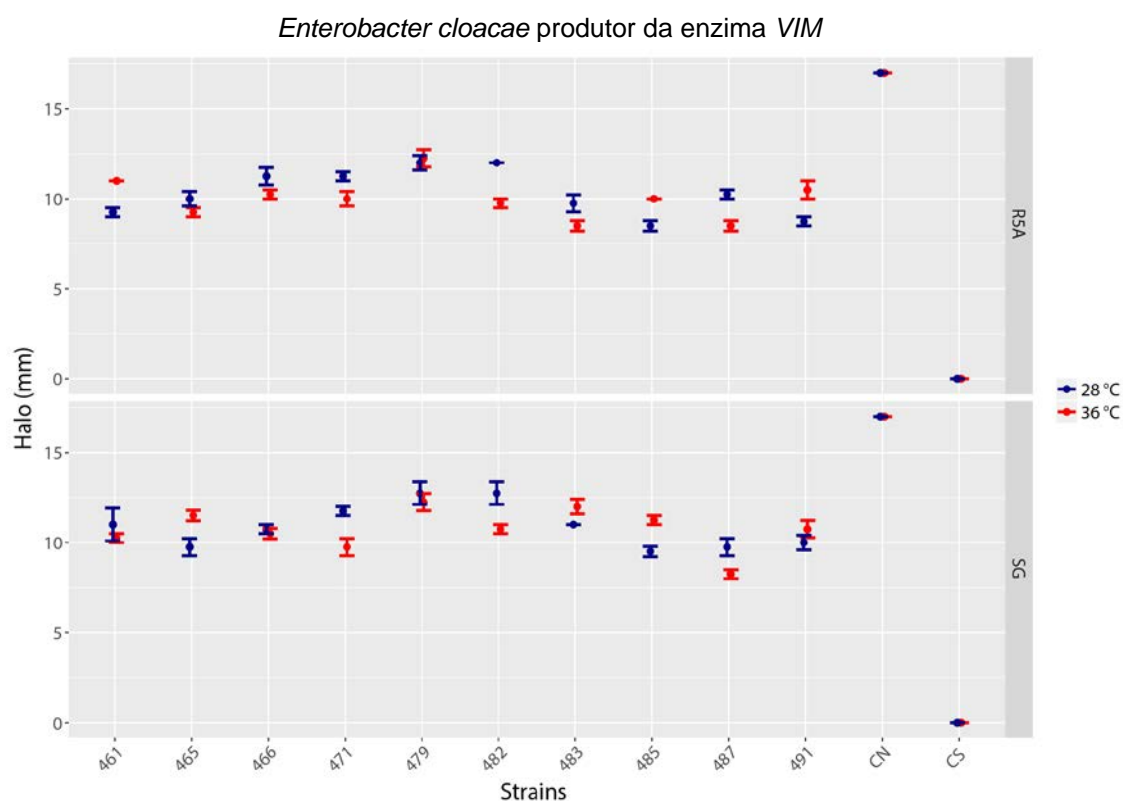


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Anfotericina B 5 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Enterobacter cloacae* produtor da enzima *VIM* os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com o extrato a partir da linhagem LGMB485 (*Micrococcus* sp.) cultivado em caldo SG a 28°C (FIGURA 22).

FIGURA 22- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Enterobacter cloacae* produtor da enzima *VIM* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

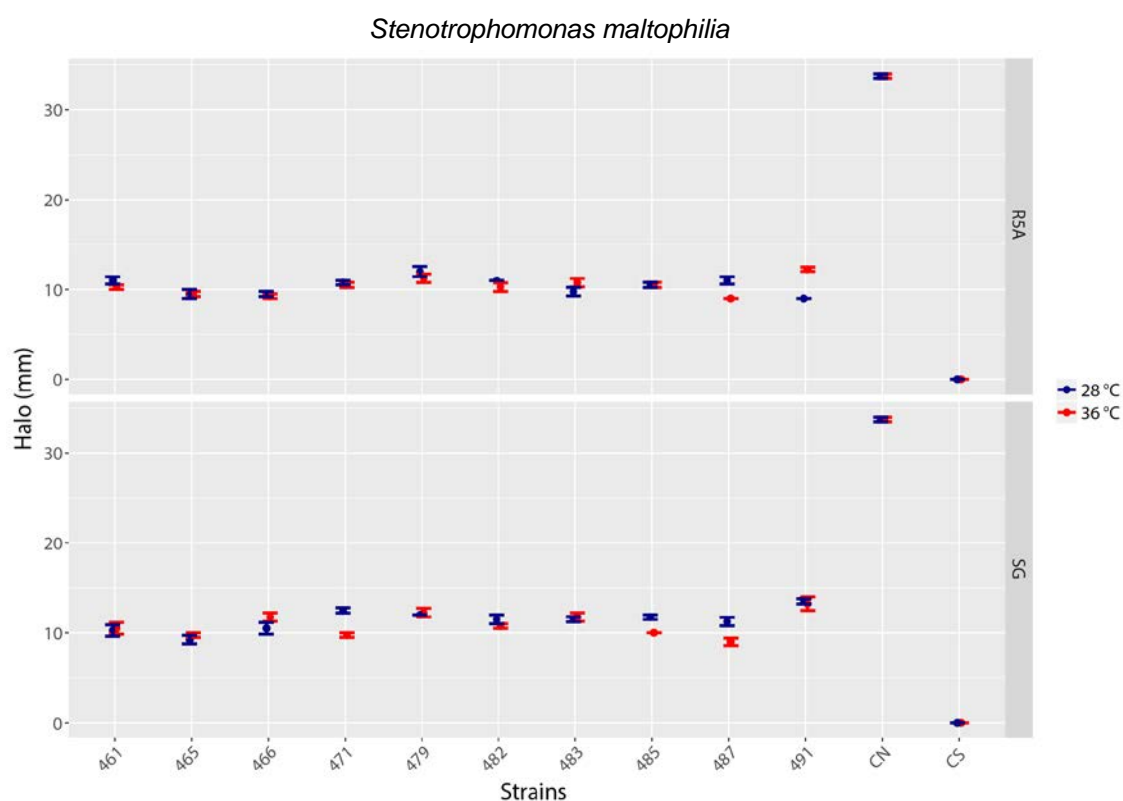


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo –Meropenem 10 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com os extratos a partir da linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) cultivados em caldo SG (FIGURA 23).

FIGURA 23- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILIMETROS (mm) DE *Stenotrophomonas maltophilia* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFITICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A

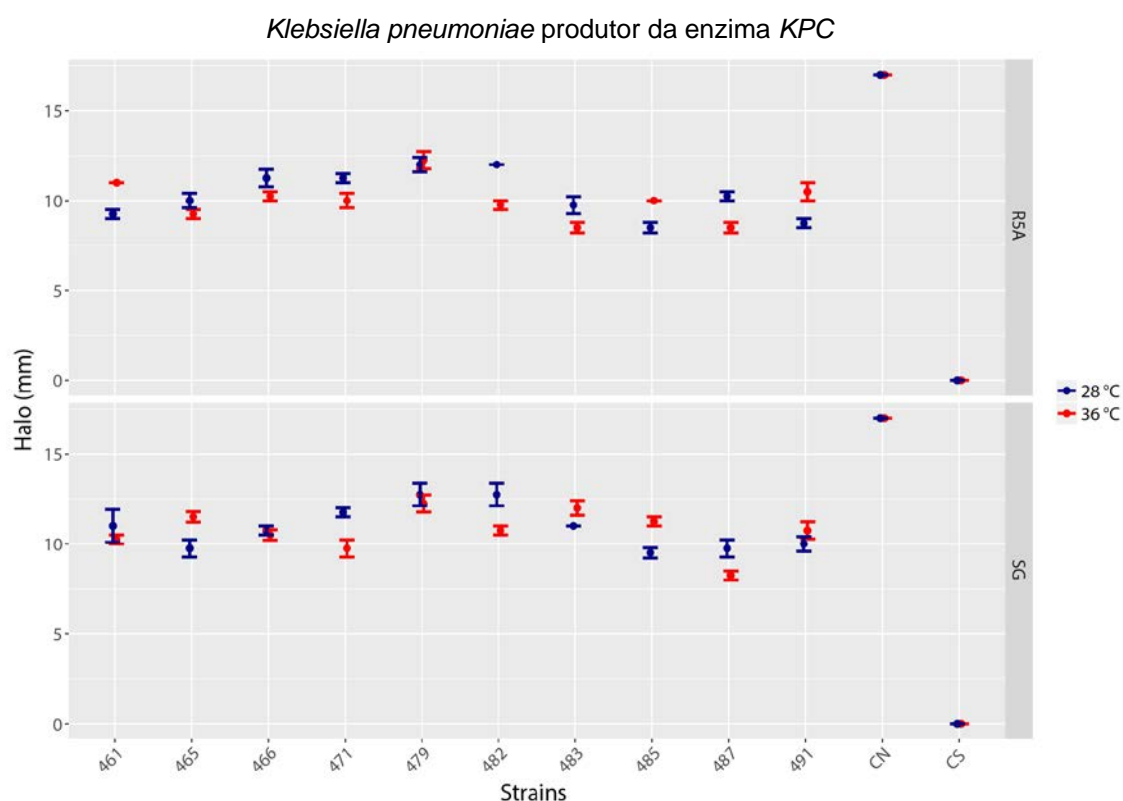


NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Meropenem 10 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Para a bactéria *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC os maiores valores de halo de inibição foram obtidos com os extratos a partir das linhagens LGMB479 (*Williamsia serinedens*) e LGMB482 (*Sphaerisporangium* sp.) ambos cultivados em caldo SG e a 28°C (FIGURA 24).

FIGURA 24- ZONA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILÍMETROS (mm) DE *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC NA PRESENÇA E AUSÊNCIA (CS) DE EXTRATOS PRODUZIDOS APÓS CULTIVO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS A 36°C E 28°C, NOS MEIOS DE CULTURA SG E R5A



NOTA: médias de 04 repetições (\pm desvio médio), CN: controle negativo – Meropenem 10 μ g/disco, CS: controle solvente – Metanol

FONTE: Rodrigo Aluizio (2017) com dados do autor

Com base nos dados apresentados, o extrato produzido a partir da linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) em meio de cultura SG a 36°C foi selecionado para a realização dos testes CIM e CBM (Concentração inibitória e bactericida mínima), devido ao maior halo de inibição contra *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) (22mm) e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (19,8mm), e também moderada atividade frente aos demais patógenos (FIGURA 16 e 17, ANEXO 9). O extrato produzido em meio de cultura SG a

36°C foi selecionado para estes testes devido ao maior rendimento apresentado nesta temperatura (TABELA 4).

Os valores obtidos de CIM para *S. aureus* sensível a metilicina e *S. aureus* resistente a metilicina foram respectivamente 0,02mg/mL e 0,04mg/mL e o valor de CBM para ambos foi de 5mg/mL (TABELA 6). O extrato apresentou ainda boa atividade contra bactérias gram negativas associadas a resistência a antibióticos como, *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase), *S. maltophilia*, *E. cloacae* produtor da enzima VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), com CIM de 0,63mg/mL e CBM de 1,25mg/mL, e para *A. baumannii* e *P. aeruginosa* CIM de 0,31mg/mL e CBM de 0,63mg/mL (TABELA 6).

TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA (CBM) DO EXTRATO A PARTIR DA LINHAGEM LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) CULTIVADA EM MEIO SG à 36°C, CONTRA PATÓGENOS CLÍNICOS

Microrganismo	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a metilicina	<u>0,02mg/mL</u>	5,0mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	<u>0,04mg/mL</u>	5,0mg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,31mg/mL	0,63mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,31mg/mL	0,63mg/mL
<i>Enterobacter cloacae</i> produtor de VIM	0,63mg/mL	1,25mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtor da enzima KPC	0,63mg/mL	1,25mg/mL
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,63mg/mL	1,25mg/mL

FONTE: O Autor (2017)

6 DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS

Actinomicetos endofíticos isolados de plantas medicinais têm sido estudados devido a capacidade de produção de diversos metabólitos secundários com atividade biológica (AZEVEDO et al., 2000; SAVI et al., 2015a). Além disso, alguns estudos têm sugerido que as propriedades medicinais de plantas podem ser consequência da capacidade dos endofíticos de produzir metabólitos biologicamente ativos (KUSARI et al., 2013; SANTOS et al., 2015). Dados os quais evidenciam a importância de estudos sobre biodiversidade de comunidades de endófitos em plantas medicinais.

Neste estudo, foram isoladas 10 linhagens a partir de folhas e pecíolos da planta medicinal *V. divergens*, resultando em frequência de isolamento de 0,34%. Essa baixa frequência de isolamento está de acordo com o realizado por Savi et al. (2015b), que realizaram o primeiro estudo sobre actinomicetos da planta *V. divergens*.

De acordo com Passari et al. (2015) a taxa de isolamento de actinomicetos de folhas é menor que a taxa a partir de raízes (com frequência aproximada de 52%). Entretanto, o presente estudo mostra que apesar de menor frequência de isolados provenientes de folhas e pecíolos do que poderia ser isolado a partir de raízes, folhas e pecíolos apresentaram grande riqueza de gêneros de actinomicetos endofíticos.

Entre as espécies isoladas e identificadas no presente estudo, as espécies *Aeromicrobium ponti* (LGMB491) e *Williamsia serinedens* (LGMB479) tem seu primeiro relato como endofíticas. A espécie *A. ponti* foi originalmente isolada de água do mar (LEE; LEE, 2008), e tem sido frequentemente encontrada neste ambiente (JIANG et al., 2010; CLAVERIAS et al., 2015). A espécie *W. serinedens* (YASSIN et al., 2007) foi descrita e isolada pela primeira vez a partir de solo contaminado com óleo e é comumente encontrada em diferentes tipos de solo (YASSIN et al., 2007).

A morfologia da linhagem LGMB491 corresponde a descrita para a espécie *A. ponti* conforme Lee e Lee (2008), como a cor amarela da colônia,

não formação de esporos, e forma de bacilos, corroborando com a análise molecular para identificação da Linhagem LGMB491 como *A. ponti*.

As análises morfológicas realizadas para a descrição da espécie *Williamsia serinedens* por Yassin et al. (2007), apresentam características como cor laranja na colônia, forma de bacilos, não produtor de esporos, que colaboram para a identificação da linhagem LGMB479 como *W.serinedens*, apresentando características que complementam a análise molecular.

A linhagem LGMB483 foi identificada como *S. thermocarboxydus*, e a primeira descrição desta espécie foi proveniente de isolamento de amostra de solo (KIM et al., 1998) e posteriormente descrito como endofítico isolado de planta medicinal da Índia por Passari et al. (2015). A linhagem LGMB483 apresenta características morfológicas similares às descritas para *S. thermocarboxydus*, como formação de cadeias longas de esporos, coloração cinza e intenso crescimento sem formação de pigmento no meio.

A linhagem LGMB482 foi identificada como *Sphaerisporangium* sp., apesar da alta similaridade com as espécies *S. melleum*, *S. viridalbum* e *S. cinnabarium*, as características morfológicas são diferentes na coloração e crescimento nos meios testados. A característica da linhagem LGMB482 em meio ISP2 confere com a apresentada por *S. melleum* coloração do micélio amarelo mel e esporos brancos, já em meio ISP4 a linhagem LGMB482 apresenta intenso crescimento e micélio aéreo bege claro e diversos pontos vermelhos (FIGURA 12). A espécie *S. cinnabarium* apresenta coloração vermelho claro e esporos brancos em todos os meios testados (ARA; KUDO, 2007). Para identificação da linhagem LGMB482, sugere-se que seja realizado o sequenciamento total do gene 16S rRNA, juntamente com o sequenciamento dos genes *gyrB*, *recA*.

Baseado na análise parcial do gene 16S rRNA foram identificadas as linhagens LGMB461 e LGMB465 como *Microbispora* sp., sendo provavelmente pertencente a uma nova espécie previamente isolada por SAVI et al. (2016) endofítica de folhas de *V. divergens* e identificada como *Microbispora* sp. Entretanto, para a confirmação desta identificação, faz-se necessário o sequenciamento adicional dos genes *gyrB* e *rpoB*, que será posteriormente realizado.

A linhagem LGMB485 foi identificada como *Micrococcus* sp. sendo os dados obtidos insuficientes para a identificação em nível de espécie. Para as linhagens LGMB471 – *Microbacterium* sp., LGMB466 e LGMB487 – *Actinomadura* sp., LGMB482 – *Sphaerisporangium* sp. apesar dos dados apontarem com possíveis espécies novas, mais estudos são necessários para descrição das mesmas. Esses gêneros são comumente associados à plantas medicinais em diferentes regiões e condições climáticas (SILVA et al., 2012, KAMIL et al., 2014, XING et al., 2014, MINGMA et al., 2014, KIM et al. 2000), no entanto, nunca foram isolados de regiões alagáveis como o Pantanal. Para a descrição destas novas espécies são necessárias técnicas como análise de sequências multilocus e DDH (Hibridização DNA-DNA) (MEYERS, 2015), além de caracterizações bioquímicas que serão realizadas em estudos futuros.

O primeiro relato de isolados dos gêneros *Microbispora*, *Micromonospora* e *Streptomyces* como actinomicetos endofíticos da planta *V. divergens* foi realizado por Savi et al. (2015a, 2015b, 2016). No presente estudo, além dos gêneros mencionados anteriormente (*Microbispora* e *Streptomyces*), foram isolados os gêneros *Actinomadura*, *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Sphaerisporangium*, *Micrococcus* e *Williamsia* (TABELA 1). Desta forma, foi ampliado o conhecimento sobre a comunidade endofítica de *V. divergens*. Além disso, a maior parte dos isolados do presente estudo são considerados actinomicetos raros, que compreendem espécies isoladas em menor frequência que estreptomicetos (JOSE; JEBAKUMAR, 2013).

6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ACTINOMICETOS A ANTIBIÓTICOS

Com o intuito de aprimorar o isolamento de actinomicetos endofíticos, o teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado. Atualmente, o ácido nalidixico é utilizado para inibição de bactérias no isolamento de actinomicetos endofíticos (LEE et al., 2008; BASKARAN et al., 2011; KADIRI et al., 2014). Todos os isolados foram resistentes ou apresentaram resistência intermediária aos antibióticos Cloranfenicol e Ampicilina, 90% apresentaram resistência a Oxacilina e 80% apresentaram resistência ao ácido nalidixico.

O Cloranfenicol apesar de ser um antibiótico de amplo espectro, é bacteriostático e grande parte das bactérias aeróbicas são resistentes a ele.

Ampicilina é uma penicilina de amplo espectro que apresenta atividade contra bacilos gram positivos e negativos (TRABULSI;ALTERTHUM, 2004). Desta forma, o Cloranfenicol e a ampicilina não seriam antibióticos apropriados para a utilização em isolamentos de actinomicetos (gram positivos).

Uma vez que a oxacilina apresenta ação principal contra *Staphylococcus* sp. e o ácido nalidíxico contra bactérias gram negativas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004), sugerimos que a oxacilina possa ser uma opção para o isolamento, sendo utilizado juntamente com o ácido nalidíxico, inibindo o crescimento de outras bactérias e proporcionando maior taxa de isolamento de actinomicetos.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os actinomicetos são um grupo de microrganismos amplamente explorados para a produção de metabólitos secundários com atividade biológica (PALOMO et al., 2013; QIN et al., 2015), porém a maior parte dos estudos são realizados com linhagens isoladas de amostras de solo (HAN et al., 2015, HOP et al., 2011, GURUNG et al., 2010, YADAV et al., 2009).

O presente trabalho explorou a atividade biológica de endófitos da planta medicinal *V. divergens*, comumente encontrada no Pantanal. Todos os extratos obtidos a partir dos actinomicetos nas quatro condições de cultivo, apresentaram atividade antibacteriana e 70% demonstraram atividade antifúngica que é proporcional ou até maior que os percentuais observados em trabalhos como de Higginbotham e Murphy (2010) e Tonial et al. (2017). No trabalho de Higginbotham e Murphy (2010), os extratos foram testados em concentrações de 100mg/mL e avaliados contra MRSA, já no trabalho de Tonial et al. (2017) o melhor resultado de inibição de *P. citricarpa* foi de 72,50%, inferior ao obtido no presente estudo em que o melhor resultado foi de 100% de inibição do fitopatógeno.

Para a produção dos metabólitos com atividade biológica, foram utilizados meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio e carbono, bem como diferentes temperaturas. Observou-se que a produção de metabólitos secundários ativos foi dependente da linhagem analisada e regulada pelas condições de cultivo, como já descrito na literatura (TRABELSI et al., 2016,

HOSKISSON et al., 2003, FENG et al., 2009, TONIAL et al., 2016, SAVI et al., 2015a).

A identificação dos isolados ea atividade biológica destes, demonstram que as plantas medicinais podem hospedar um grupo diverso de microrganismos produtores de metabólitos secundários, que suportam a hipótese de que as propriedades medicinais das plantas podem estar associadas à sua comunidade endofítica (STROBEL et al., 1999).

O fitopatógeno *P. citricarpa* é o agente causal da mancha preta em citros (CBS) e *C. abscissum*, da doença de podridão floral dos citros (PFD) (de MENEZES et al., 2014). A CBS está correlacionada com restrições fitossanitárias para exportar frutas para a Europa (SANTOS et al., 2016), já o PFD está associada a grandes perdas econômicas (de MENEZES et al., 2014). Ambas as doenças afetam a cultura de citros em todo o mundo e compostos eficazes para o tratamento de doenças são necessários, assim, alguns estudos realizados já buscam alternativas para o controle de destes fitopatógenos (SAVI et al, 2015; HOKAMA et al., 2016, PENÃ et al., 2016; TONIAL et al. 2017).

No presente estudo o extrato produzido a partir do isolado LGMB471 (*Microbacterium* sp.) mostrou atividade contra os fungos *P. citricarpa* (100% de inibição) e *C. abscissum* (50%). Este gênero já foi relatado como produtor de metabólitos secundários com atividade biológica e como promotor de crescimento de plantas (SILVA et al., 2012, KAMIL et al., 2014), porém, este é o primeiro relato do gênero *Microbacterium* com ação antifúngica contra os fitopatógenos *C. abscissum* e *P. citricarpa*. Para o fungo *P. citricarpa* o extrato produzido pela linhagem *Microbacterium* sp. LGMB471 (em meio SG, 36°C) apresentou concentração Inibitória mínima (CIM) e Fungicida (CFM) de 0,16 mg/mL, o que sugere forte mecanismo de ação dos metabólitos avaliados e demonstram o alto potencial desta linhagem para utilização como controle biológico, bem como para outros estudos de bioprospecção, sendo necessária a elucidação dos compostos e mais testes *invitro* e *in vivo*.

A inibição de crescimento da bactéria gram positiva *S. aureus* (sensível e resistente a metilicina) pelos extratos produzidos a partir de actinomicetos variou de 8,75 a 24,2mm, sendo o melhor resultado observado para o extrato produzido pela linhagem *A. ponti* (LGMB491) (ANEXO 9).O extrato desta

linhagem também causou considerável inibição das bactérias gram negativas, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* e *E. cloacae* produtor da enzima VIM (TABELA 6). Considerando a dificuldade no tratamento de infecções hospitalares causadas por estas bactérias, os resultados obtidos são relevantes e estudos para a identificação destes compostos são importantes. O gênero *Aeromicrobium* é conhecido pela produção de metabolitos com atividade biológica (AXENOV-GRIBANOV et al., 2016; CLAVERIAS et al 2015) e pela produção do antibiótico Eritromicina pela espécie *A. erythreum* (MILLER; WOESE; BRENNER, 1991). Entretanto, este é o primeiro relato da produção de extratos com atividade biológica por isolados da espécie *A. ponti*.

Para explorar a atividade dos metabólitos secundários de *A. ponti* (LGMB491), avaliamos a concentração Inibitória Mínima (CIM) e bactericida (CBM). Os valores de CIM contra MSSA e MRSA (gram positivas) foram 0,02 e 0,04 mg/mL, respectivamente. O valor de CBM foi de 5 mg/mL para este extrato, sendo bem superior ao CIM. Por outro lado, este extrato apresentou valores de CIM e CBM próximos (0,31 e 0,63 mg/mL respectivamente) contra as bactérias gram negativas *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, e também contra *K. pneumoniae* produtor da enzima KPC, *S. maltophilia*, e *E. cloacae* produtor da enzima VIM. (CIM: 0,63 mg/mL e CBM: 1,25 mg/mL). Estes dados sugerem a possibilidade de utilizar os metabólitos secundários produzidos por LGMB491 (*A. ponti*) no tratamento de infecções tanto de bactérias gram positivas quanto negativas. A importância destes extratos é reforçada quando os valores de CIM e CBM observados nesse estudo são comparados a valores obtidos em estudos realizados por Gurung et al. (2010) e Campos et al. (2015).

O surgimento e a disseminação da resistência aos antibióticos entre bactérias patogênicas, como MRSA, tem sido um problema crescente para a saúde pública nas últimas décadas. Além disso, grande número de espécies demonstram resistência intrínseca a antibióticos, como *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (BROKE, 2012; BONOMO et al., 2016), e portanto, também têm sido associados a grande número de infecções hospitalares. Em fevereiro de 2017, a organização mundial da saúde, publicou uma lista das 12 principais bactérias que necessitam urgentemente de novos antibióticos para tratamento (WHO, 2017b). Três espécies citadas foram utilizadas no presente estudo (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus*

resistente a meticilina), e para as quais o extrato produzido pela linhagem por LGMB491 (*A. ponti*) apresentou resultados promissores.

Além da elevada atividade biológica observada, este é o primeiro relato de atividade biológica para linhagens do gênero *Williamsia*, de forma que a espécie *W. Serinedens* (LGMB479) apresentou atividade moderada contra patógenos clínicos e fitopatógenos avaliados. Os outros gêneros isolados, *Sphaerisporangium*, *Micrococcus*, *Microbispora* e *Streptomyces*, foram associados com alta atividade biológica e produtores de antibióticos como polifosfato, clorexidina, kocurina, siderocromos, índoles e carbolinas (JANSO; CARTER 2010, MITCHELL; MOYLE, 1951, RYE; WISEMAN, 1964, PALOMO et al., 2013, TAIT, 1975, QIN et al., 2015, SAVI et al., 2015a, KIM et al., 2000).

6.3.1 Considerações finais

Neste estudo ampliamos o conhecimento sobre a comunidade endofítica da planta medicinal *V. divergens*, reportando pela primeira vez, o isolamento de actinomicetos raros como *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Sphaerisporangium* e *Williamsia*, sendo algumas delas não isoladas anteriormente como endófitos.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que em estudos futuros seja utilizada a sequência completa do gene 16S rRNA e quando disponíveis outros genes para a identificação de espécies.

Pela análise do gene 16S rRNA as linhagens LGMB471 – *Microbacterium* sp., LGMB466 e LGMB487 – *Actinomadura* sp., LGMB482 – *Sphaerisporangium* sp mostram-se diferente das espécies previamente descritas na literatura, e sugere-se a MLSA e a análise de hibridização de DNA-DNA para a descrição das possíveis novas espécies.

As linhagens isoladas apresentaram alto potencial para os setores farmacêutico e agrônomo, pela produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Corroborando com a hipótese de que plantas medicinais abrigam microrganismos com alto potencial biotecnológico (STROBEL et al., 1999). Desta forma, sugere-se a realização de novos isolamentos de actinomicetos a partir da planta medicinal *V. divergens* e outras plantas

medicinais presentes no Pantanal ainda não estudadas, ampliando as regiões de coleta, e variando os antibióticos utilizados no isolamento.

Os metabólitos produzidos pela linhagem LGMB491 (*Aeromicrobium ponti*) apresentaram boa atividade contra todos os patógenos clínicos testados, principalmente MRSA, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os metabólitos produzidos pela linhagem LGMB471, foram capazes de inibir de 81 a 100% o crescimento micelial do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. Assim, são necessários mais estudos para o isolamento e identificação dos metabólitos secundários produzidos por estes isolados, afim de identificar os compostos associados a atividade biológica. Para estudos futuros podemos sugerir que além de diferentes meios de cultura e temperaturas, seja também avaliada a influência do tempo de cultivo e diferentes pH, para a produção de metabólitos ativos. Além de co-cultivo de actinomicetos-fungos, bactérias-actinomicetos e actinomiceto-actinomicetos, com o intuito de avaliar a produção de metabólitos biologicamente ativos nas relações entre espécies.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluí-se que:

- Os gêneros *Actinomadura*, *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Sphaerisporangium*, *Streptomyces* e *Williamsia*, foram isolados como endofíticos da planta *Vochysia divergens*.
- Os extratos obtidos a partir dos isolados são promissores para prospecção de compostos com atividade antimicrobiana, desta forma, a exploração da comunidade endofítica da planta *Vochysia divergens*, se mostra importante.
- Todos os extratos obtidos apresentaram atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e outros 6 patógenos clínicos. O extrato produzido a partir da linhagem de *Aeromicrobium ponti* (LGMB491) apresentou maior atividade.
- Quanto aos fitopatógenos testados, 70% dos extratos apresentaram atividade contra *Colletotrichum abscissum* e *Phyllosticta citricarpa*. O extrato a partir da linhagem LGMB471 apresentou 100% de inibição do crescimento micelial de *P. citricarpa*.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology**. v. 33, p. 798–811, 2015.
- ADEGBOYE, M. F.; BABALOLA, O. O. Actinomycetes : a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, p. 786–795, 2013.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Informações sobre KPC**, 2012.
Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=kpc&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=2869368&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>. Acesso em: 19 mar. 2017.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). **II. gram-positivos - resistência aos antimicrobianos**, 2017.
Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso em: 19 mar. 2017.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology, Revista Brasileira de Biologia**, v. 68, p. 957–966, 2008.
- ARA, I.; KUDO, T. *Sphaerosporangium* gen. nov., a new member of the family Streptosporangiaceae, with descriptions of three new species as *Sphaerosporangium melleum* sp. nov., *Sphaerosporangium rubeum* sp. nov. and *Sphaerosporangium cinnabarinum* sp. nov., and transfer of *Streptosporangium viridialbum* Nonomura and Ohara 1960 to *Sphaerosporangium viridialbum* comb. nov. **Actinomycetologica**. v. 21, p.11–21, 2007.
- ARIEIRA, J.; CUNHA, C. N. DA. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysiadivergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n.3, p. 569–580, 2006.
- AXENOV-GRIBANOV, D. et al. The isolation and characterization of actinobacteria from dominant benthic macroinvertebrates endemic to Lake Baikal. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 2, p. 159–168, 2016.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000.
- BALTZ, R. H. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. **Microbe**, v.2, n.3, p.125–131, 2007.
- BASKARAN, R. et al. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 7, p.26–32, 2011.
- BONOMO, R.A.; DORA, S; Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, n.43, 2006.
- BORTALANZA L.B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal Pharmacology**, v.453, n.25, p.203-208, 2002.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nat. Rev. Microbiol.** v.11. p. 21–32, 2013.

BROOKE, J. S.; *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews.** v.25, n.1 p. 2– 41, 2012.

CAMPOS, F.F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** p.1-10, 2015.

CLAVERÍAS, F. P. et al. Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaíso bay, Chile; **Frontiers in Microbiology**, p. 1-11, 2015

Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories. **CLSI publication M100-S25**, 2015.

de MENEZES, H.D. et al. In vitro Photodynamic Inactivation of Plant-Pathogenic Fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Pheno Thiazinium Photosensitizers. **Applied and Environmental Microbiology** v.80, n.5, p.1623–1632, 2014.

DUCEI, G. et al. **Disease, Communicable, 'Prevention of Hospital-Acquired Infections World Health Organization'** Pratical guide, 2ªedition, 2002.

FAGAN, C.; GOES, A.; Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjas 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** Editora Ceres, São Paulo. v.2. p. 239-269. 2005

FENG, Z. et al. Engineered production of iso-migrastatin in heterologous *Streptomyces* hosts. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2147–2153 , 2009.

FERNÁNDEZ, E. et al. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug Mithramycin. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.18, p.4929–4937, 1998.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M.; Bioactive Secondary Metabolites Produced by Microorganisms Associated with Plants', **Biologia, Bratislava**, v.62, n.3, p.251–57, 2007.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Doenças e Pragas: Pinta Preta**, 2017.

Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 19 mar. 2017

GLIENKE, CHIRLEI. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Dissertação,1999.

GOLINSKA, P. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.108, n.2, p.267–289, 2015.

GURUNG, T. D.; SHERPA, C.; AGRAWAL, V. P.; LEKHAK, B. Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. **Nepal Journal of Science and Technology**, v.10, p.173–182, 2010.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT.** Nucleic Acids Symposium Series, v. 41, p.95–98, 1999.

- HAN, L. et al. *Streptomyces kanasensis* sp. nov., an Antiviral Glycoprotein Producing Actinomycete Isolated from Forest Soil Around Kanas Lake of China. **Current Microbiology**, v.71, n.6, p.627–631, 2015.
- HESS, S.C. et al. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal Ethnopharmacology**. v.74, p.97-100, 1995.
- HIGGINBOTHAM, S. J.; MURPHY, C. D.; Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v.165, n.1, p.82–86, 2010.
- HIRSCH, A. M.; VALDÉS, M..Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, n.4, p.536–542, 2010.
- HOKAMA, Y. et al. Endophytic Fungi Isolated from *Vochysiadivergens* in the Pantanal, Mato Grosso do Sul: Diversity, Phylogeny, and Biocontrol of *Phyllosticta citricarpa*. Endophytic Fungi: Diversity, Characterization and Biocontrol. **Hauppauge: Nova Publishers**, 4ed, v. 4, 2016.
- HOLMES, A. H. et al. 'Understanding the Mechanisms and Drivers of Antimicrobial Resistance', **The Lancet**, n. 387, p. 176–87, 2016.
- HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9^{ed}. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 71-174,1994.
- HOP, D. V.; SAKIYAMA, Y.; BINH, C.T.T.; OTOGURO, M.; et al. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. **The Journal of antibiotics** v. 64, n. 9, p. 599–606 , 2011.
- HOSKISSON, P. A.; SHARPLES, G. P.; HOBBS, G.; The importance of amino acids as carbon sources for *Micromonosporaechinospora* (ATCC 15837). **Letters in Applied Microbiology** v. 36, n. 5, p. 268–271, 2003.
- IPPC – International Plant Protection Convention, **DP 5: Phyllostictacitricarpa(McAlpine) Aa on Fruit**, editora: IPPC, 2014
- JANSO, J.; CARTER, G.T.; Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. **Applied and Environmental Microbiology** v. 76, n. 13, p. 4377–4386, 2010.
- JIANG, H. et al. Actinobacterial diversity of marine sediment samples from Chile.**Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.50, n.7, p.862-9, 2010.
- JORGE, M. H. A. As plantas medicinais no Pantanal. **Embrapa**, n.70, p.1–3, 2004.
- JOSE, P.A.; JEBAKUMAR, S.R.D. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. **Frontiers Microbiology**. v.4, n.240, 2013.
- KADIRI, K. S. Screening and Isolation of Antagonistic Actinobacteria Associated With Marine Sponges from Indian Coast. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 8, p. 8–10, 2014.
- KAMIL, I. et al. Molecular Identification of Different Actinomycetes Isolated from East Black Sea Region Plateau Soil by 16S rDNA Gene Sequencing, **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.878–87, 2014.
- KATZ, L., BALTZ, R. H., 'Natural Product Discovery: Past, Present, and Future', **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.155–76, 2016

KAVITHA, A., PRABHAKAR, P., NARASIMHULU, M.; Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL_113. **Microbiological Research**. v.165, n.3, p.199–210, 2010.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. Editora Premier, 2° ed., p.256, 1999.

KIM, S.B. et al. *Streptomyces* *thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydophilic species from soil, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p. 59–68, 1998.

KIM, B.S et al. Structure Elucidation and Antifungal Activity of an Anthracycline Antibiotic, Daunomycin, Isolated from *Actinomadura Roseola*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, n.5, 2000.

KUSARI, S. et al. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v.91, p.81–87, 2013.

LEE, S. O. et al. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.11, p.1741–1746, 2008.

LEE, D. W.; LEE, S. D.; *Aeromicrobium ponti* sp. nov., isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 58, p. 987–991, 2008.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MEYERS, P.R.; Gyrase subunit B amino acid signatures for the actinobacterial family *Streptosporangiaceae*. **Systematic Applied Microbiology**. v.4, p.252–260, 2014.

MILLER, E.S.; WOESE, C. R; BRENNER, S. Description of the Erythromycin-Producing Bacterium *Arthrobacter* sp. Strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythrum*. **International journal of systematic bacteriology**, v.368, p. 363–368, 1991.

MITCHELL, B.Y.P.; MOYLE, J.; Isolation of Hydrolytic Products of a Glycerophospho-compound from *Micrococcus pyogenes*. **J. gen. Microbial**. p. 966–980, 1951

MINGMA, R. et al. *Sphaerisorangium rufum* sp. nov., an endophytic actinomycete from roots of *Oryza sativa* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.1077–1082, 2014.

MOHSENI, M. et al. Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian sea. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v.2, p.64–71, 2013.

MUN, H. S. et al. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v.30, n.5, p.401–407, 2007.

NETZKER, T. et al. 'Microbial Communication Leading to the Activation of Silent Fungal Secondary Metabolite Gene Clusters', **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1–13, 2015.

NEVES, M. et al. **O retrato da Citricultura Brasileira**. São Paulo: Maskstrat, 138 p., 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Divulgação Da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.301–7, 2008.

PALOMO, S. et al. Sponge-Derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as Sources of the New Thiazolyl Peptide Antibiotic Kocurin, **Marine Drugs**, v.11, p.1071–86, 2013.

- PASSARI, A. K. et al. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1–13, 2015.
- PARADIS E., 2010 pegas: an {R} package for population genetics with an integrated–modular approach. **Bioinformatics**. n.26, p.419–420
- PENA, L. C. et al. A *Muscodor* Strain Isolated from *Citrus Sinensis* and Its Production of Volatile Organic Compounds Inhibiting *Phyllosticta citricarpa* Growth', **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.124, p.349–360, 2016.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. **Microbiology of the Phyllosphere**. p.175-87, 1986.
- POSSIEDE, Y. M. et al. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. Brazilian **Journal of Microbiology**, v.40, p.308–313, 2009.
- POTT, A. et al.; Plantas Úteis à Sobrevivência No Pantanal. **IV Simpósio Sobre Recurso Naturais E Sócio-Econômico Do Pantanal**, p.1–16, 2004.
- QIN, S. et al. Biodiversity and Plant Growth Promoting Traits of Culturable Endophytic Actinobacteria Associated with *Jatropha Curcas* L. Growing in Panxi Dry-Hot Valley Soil, **Applied Soil Ecology**, v.93, p.47–55, 2015.
- RAEDER, U., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, n.1, p.17-20, 1985.
- RAGBETLI, C. et. al. Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by Years, **Hindawi Publishing Corporation**. (2016)
- RONG, X., & HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.1, p.7–18, 2012.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes version 3.2 **Manual: Tutorials and Model Summaries**, 2011.
- RSTUDIO Team *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2015.
- RYE, R. M.; WISEMAN, D. Phosphorus-32-Containing Compounds from, **J. Pharm. Pharmacol.** p.516–21, 1964.
- RYNGA, D., et al. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Delhi, India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 40, 2015.
- SANTOS, H. S. et al., 'Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of Essential Oils from *Croton Zehntneri*.' , **Nat.Prod.Comm.**, v.2, p.1233–36, 2007.
- SACCARO JUNIOR, Nilo L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011
- SANTOS, I. P. et al. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi from Leaves of *Indigofera Suffruticosa* Miller (Fabaceae)', **Frontiers in Microbiology**, v6, p.1–7, 2015.
- SANTOS, P. J. C. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research** (Print), v.186, p.153-160, 2016.

SAVI, D. C. et al. *Microbispora* sp. LGMB259 Endophytic Actinomycete Isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) Producing β -Carbolines and Indoles with Biological Activity. **Current Microbiology**, v.70, n.3, p.345–354, 2015a.

SAVI, D.C. et al. Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic actinomycetes isolated from *Vochysiadivergens*. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v.5, p.347-356, 2015b.

SAVI, D. C. et al. 16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.109, p.801–815, 2016.

SCALOPPI, E. M. T. **Determinação do efeito curativo de infecções de *Guignardia citricarpa* em frutos cítricos mediante o emprego de fungicidas sistêmicos e mesostêmicos.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias, Jaboticabal, 103 f, 2006.

SCHLIEP K.P. **phangorn**: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, v.27, p.592-593, 2011

SHAABAN, et al., Landomycins P-W, cytotoxic angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. **J. Nat. Prod.** v. 74, p. 2-11, 2011.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.16, n.3, p.313–340, 1966.

SILVA, M. P. et al. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.2, p.143–152, 2000.

SILVA, H. S. A. et al.. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control** v. 63, n. 1, p. 62–67 , 2012.

SOLTANI, J.; MOGHADDAM, M. S. H. Diverse and bioactive endophytic Aspergilli inhabit Cupressaceae plant family. **Archives of Microbiology**. v.196, n. 9, p. 635–644 , 2014.

STROBEL, G. A. et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf quercina. **Microbiology**, v.145, p.1919–1926, 1999.

STROBEL, G. et al. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biological Review**, v.67, p.491–502, 2003.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, n.2, p.257–268, 2004.

TAIT, G. H. The Identification and Biosynthesis of Siderochromes Formed by *Micrococcus denitrificans*. **Biochemistry journal**. p.191–204, 1975.

TAMURA, K. et al. **Software MEGA 6.06**, 2013.

TIWARI, K. et al.. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, p.108-132, 2011.

TRABELSI, I. et al. Antimicrobial Activities of Some Actinomycetes Isolated from Different Rhizospheric Soils in Tunisia. **Current Microbiology**, v.73, n.2, p.220–227, 2016.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TONIAL, F. et al. Influence of culturing conditions on bioprospecting and the antimicrobial potential of endophytic fungi from *Schinus terebinthifolius*. **Current Microbiology** (Print), v.71, p.1-11, 2016.

TONIAL, F. et al. Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letter**, v.1, p.1, 2017.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L..Microbiologia, 10. ed. Tradução de Aristóbolo Mendes da Silva. Porto Alegre. Editora Artmed, 2012.

WILLIAMS, S. T. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**,. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, v. 4, 1989.

WHO – World Health Organization, **Anttimicrobial resistance**, Fact sheet nº 194, 2015.

WHO – World Health Organization, **Anttimicrobial resistance**, Fact sheet. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Anttimicrobial resistance**, 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/>. Acesso em: 29 mar. 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**, 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 29 mar. 2017

XING, J. et al. *Sphaerisporangiumdianthi* sp. nov., an Endophytic Actinomycete Isolated From a Root of *Dianthus chinensis* **Antonie Van Leeuwenhoek** ,v.107, n.1, p.9-14, 2014.

YADAV, A. K. et al. Novel copper resistant and antimicrobial Streptomyces isolated from Bay of Bengal, India. **Journal de Mycologie Medicale**. v.19, n.4, p.234–240 , 2009.

YASSIN, A. F. et al. *Williamsia serinedens* sp. Nov., Isolated from an Oil-Contaminated Soil, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.558–61, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura* (1 de 10)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[1] <i>Actinomadura alba</i>														
[2] <i>Actinomadura amylolytica</i>	94,72													
[3] <i>Actinomadura apis</i>	93,79	93,94												
[4] <i>Actinomadura atramentaria</i>	93,01	94,29	94,79											
[5] <i>Actinomadura bangladeshensis</i>	94,29	95,65	97	95,79										
[6] <i>Actinomadura cellulolytica</i>	94,58	98,07	94,08	94,29	95,44									
[7] <i>Actinomadura chokoriensis</i>	93,3	94,86	96,08	94,72	98,64	94,44								
[8] <i>Actinomadura citrea</i>	94,15	94,79	97,15	95,86	98,07	94,94	97							
[9] <i>Actinomadura coerulea</i>	93,58	94,51	96,72	96,01	97,65	94,58	96,58	98,79						
[10] <i>Actinomadura cremea</i>	92,94	94,01	98,72	94,72	96,93	94,22	96,08	97,22	96,79					
[11] <i>Actinomadura darangshiensis</i>	94,08	95,22	96,43	95,29	98,22	95,44	97,15	97,57	96,86	96,36				
[12] <i>Actinomadura echinospora</i>	95,44	97,43	94,94	94,22	95,58	97,22	94,58	95,36	94,86	94,08	95,22			
[13] <i>Actinomadura fibrosa</i>	94,94	95,08	96,93	95,86	97,08	94,94	96,01	97,43	97,29	96,01	96,15	95,72		
[14] <i>Actinomadura flavalba</i>	93,72	95,15	95,29	97,08	96,29	95,51	95,22	96,29	95,65	95,22	96,36	95,01	96,22	
[15] <i>Actinomadura formosensis</i>	93,51	94,51	96,86	95,44	97,43	94,51	96,5	97,93	97,36	96,93	97	94,65	96,65	95,44
[16] <i>Actinomadura geliboluensis</i>	94,01	95,15	97,43	96,08	98,64	95,29	97,72	98	97,57	97,36	97,86	95,29	96,86	96,29
[17] <i>Actinomadura glauciflava</i>	94,15	95,08	97,43	95,86	98,22	95,15	97,15	99,5	99,14	97,5	97,43	95,44	97,72	96,36
[18] <i>Actinomadura hallensis</i>	94,58	93,79	94,94	94,22	95,93	94,15	94,94	95,22	94,79	94,94	95,22	94,08	94,44	94,72
[19] <i>Actinomadura keratinilytica</i>	94,29	94,15	95,58	96,08	95,51	94,58	94,51	95,08	94,65	94,65	95,01	95,15	95,93	96,29
[20] <i>Actinomadura kijaniata</i>	94,01	94,79	96,01	95,51	96,5	94,72	95,44	95,86	95,51	95,08	96,01	94,94	96,58	96,65
[21] <i>Actinomadura latina</i>	93,94	94,72	96,43	95,08	97,72	94,86	96,79	96,93	96,22	96,22	97,57	94,65	96,08	95,86
[22] <i>Actinomadura luteofluorescens</i>	93,58	94,51	96,65	95,72	97,65	94,51	96,58	98,64	99,14	96,72	96,79	94,86	97	95,72
[23] <i>Actinomadura macra</i>	93,72	94,58	96,15	95,51	97,36	94,29	96,43	97,79	98,07	96,08	97	94,94	96,22	95,15
[24] <i>Actinomadura madurae</i>	94,58	95,36	97,15	95,44	98,22	95,22	97,15	98,22	97,36	97	98,57	95,51	96,79	96,36

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 2 de 10)

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[25]	<i>Actinomadura mexicana</i>	94,22	94,94	97,08	95,72	98	95,01	96,93	99,36	98,57	97,08	97,43	95,08	97,36	96,36
[26]	<i>Actinomadura namibiensis</i>	93,94	94,72	96,08	95,36	96,29	94,79	95,29	95,72	95,29	95,22	95,79	95,01	96,36	96,5
[27]	<i>Actinomadura meyeræ</i>	93,94	95,22	97	95,86	98,93	95,22	97,86	98,07	97,86	96,86	97,79	95,36	96,79	96,43
[28]	<i>Actinomadura nitriligenes</i>	95,01	95,29	96,72	95,86	97,57	95,51	96,5	97,22	97	95,79	96,93	96,22	98,22	96,65
[29]	<i>Actinomadura miaoliensis</i>	93,94	94,44	95,44	96,01	96,01	94,58	95,01	95,36	94,94	94,58	95,36	95,44	96,29	96,36
[30]	<i>Actinomadura rifamycinii</i>	92,65	92,87	98,43	94,29	95,79	93,08	94,72	95,93	96,36	97,79	95,44	93,79	95,86	94,37
[31]	<i>Actinomadura rayongensis</i>	92,94	94,79	95,08	97,08	96,08	94,79	94,94	96,22	95,79	95,08	95,01	94,72	96,08	96,72
[32]	<i>Actinomadura napierensis</i>	94,44	95,15	96,93	95,58	98,22	95,01	97,22	97,57	97	96,86	97,43	95,01	96,93	96,58
[33]	<i>Actinomadura rugatobispora</i>	92,87	94,08	94,79	94,94	96,58	93,65	95,79	95,93	96,29	94,86	96,08	93,94	95,29	95,15
[34]	<i>Actinomadura rubrobrunea</i>	93,22	93,72	94,65	94,58	94,65	93,51	93,79	94,01	93,51	94,08	94,22	94,37	94,58	95,29
[35]	<i>Actinomadura scrupuli</i>	95,22	94,86	94,65	93,3	95,15	95,01	94,15	94,51	94,44	93,79	95,01	95,93	95,51	94,44
[36]	<i>Actinomadura umbrina</i>	94,44	97	93,94	93,79	95,22	97,5	94,37	94,65	94,37	94,08	95,44	96,65	94,72	95,15
[37]	<i>Actinomadura sputi</i>	94,51	94,44	95,22	94,44	96,5	94,22	95,51	95,44	94,94	95,22	95,86	94,37	94,44	95,22
[38]	<i>Actinomadura viridilutea</i>	93,15	93,65	94,58	94,51	94,58	93,44	93,72	93,94	93,44	93,87	94,15	94,29	94,51	95,22
[39]	<i>Actinomadura sediminis</i>	92,44	93,94	97,15	94,44	96,79	93,65	95,86	96,29	95,86	97,29	96,08	93,94	95,36	94,72
[40]	<i>Actinomadura yumaensis</i>	93,79	94,72	95,44	94,37	96,79	94,72	96,01	96,65	96,29	95,58	96,08	94,72	95,72	95,44
[41]	<i>Actinomadura vinacea</i>	93,65	95,08	95,22	95,01	97	94,65	96,15	96,65	96,15	95,29	96,43	95,01	95,65	95,22
[42]	<i>Actinomadura xylanilytica</i>	94,86	95,65	96,22	96,43	97,86	95,86	96,79	97,79	97,36	96,29	97,08	95,79	98	97,15
[43]	<i>Actinomadura livida</i>	94,44	94,86	95,29	94,51	96,58	95,01	95,65	96,22	95,79	95,22	95,86	94,86	95,58	95,15
[44]	<i>Actinomadura hibisca</i>	93,37	93,65	96,15	95,58	96,22	94,01	95,22	96,15	95,79	95,29	95,72	94,58	96,93	96,5
[45]	<i>Actinomadura meridiana</i>	93,15	94,29	95,72	94,44	96,93	94,44	95,93	97,08	96,29	95,79	96,93	94,51	95,79	94,86
[46]	<i>Actinomadura fulvescens</i>	94,29	94,72	96,65	95,22	97,86	94,65	96,86	97,36	96,72	95,79	96,93	95,86	97,36	95,93
[47]	<i>Actinomadura chibensis</i>	93,3	94,79	95,22	93,94	96,72	95,01	95,86	96,01	95,58	95,15	96,01	95,08	95,08	94,86
[48]	<i>Actinomadura catellatispora</i>	92,37	92,87	93,22	92,58	94,65	93,01	93,65	94,15	93,72	93,15	93,79	92,87	93,51	93,08
[49]	<i>Actinomadura pelletieri</i>	93,08	93,79	95,58	93,87	96,08	94,01	95,15	95,86	95,36	95,65	95,65	94,29	94,79	94,08

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 3 de 10)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[50] <i>Actinomadura oligospora</i>	93,72	94,22	95,72	95,36	96,01	94,08	95,08	95,65	95,01	94,65	95,08	95,08	95,72	96,01
[51] <i>Actinomadura rudentiformis</i>	94,58	94,79	96,86	94,94	97,36	94,79	96,36	96,58	96,15	96,01	97,43	95,58	96,93	95,72
[52] <i>Actinomadura rupiterrae</i>	93,22	94,22	94,72	94,58	95,01	94,44	93,94	94,37	93,72	93,79	94,72	94,65	94,79	95,22
[53] <i>Actinomadura verrucospora</i>	93,44	94,51	96,43	95,72	97,65	94,51	96,58	98,36	99,14	96,5	96,72	94,86	96,86	95,44
[54] <i>Actinomadura viridis</i>	93,65	95,01	95,36	94,86	97	94,79	96,15	96,72	96,15	95,44	96,36	94,86	96,08	95,29
[55] <i>Actinomadura syzygii</i>	93,15	94,65	95,72	95,01	97,65	94,94	96,65	97	96,58	95,72	96,86	95,22	96,15	95,36
[56] <i>LGMB487</i>	94,94	94,94	96,93	94,72	97,22	95,08	96,29	96,36	95,93	95,93	97,36	95,72	96,93	95,79
[57] <i>LGMB466</i>	95,22	95,36	97,15	95,44	97,43	95,51	96,5	96,58	96,15	96,15	97,43	96,29	97,65	96,5
[58] <i>Streptomyces glauciniger</i>	89,59	89,94	90,09	89,23	90,01	89,44	89,3	89,94	89,66	89,59	89,8	90,01	90,73	90,16

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 4 de 10)

	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]
[16] <i>Actinomadura geliboluensis</i>	98,5													
[17] <i>Actinomadura glauciflava</i>	97,93	98,15												
[18] <i>Actinomadura hallensis</i>	94,86	96,15	95,36											
[19] <i>Actinomadura keratinilytica</i>	95,01	95,86	95,22	94,94										
[20] <i>Actinomadura kijaniata</i>	95,15	96,01	96,01	94,01	95,79									
[21] <i>Actinomadura latina</i>	96,72	97,57	96,79	95,22	94,94	95,72								
[22] <i>Actinomadura luteofluorescens</i>	97,08	97,57	99,14	94,79	94,58	95,44	96,15							
[23] <i>Actinomadura macra</i>	96,65	97,22	97,79	94,79	94,44	94,86	96,36	97,93						
[24] <i>Actinomadura madurae</i>	97,29	98,15	97,93	95,44	95,22	96,22	97,65	97,36	97,22					
[25] <i>Actinomadura mexicana</i>	97,93	97,93	99,29	95,29	95,08	95,72	97,08	98,43	97,5	98,07				
[26] <i>Actinomadura namibiensis</i>	95,08	95,93	95,86	94,08	95,93	99,5	95,72	95,22	94,72	96,15	95,58			
[27] <i>Actinomadura meyeriae</i>	97,5	98,72	98,22	95,86	95,44	96,29	97,36	97,86	97,22	98	98	96,15		
[28] <i>Actinomadura nitritigenes</i>	96,43	97,5	97,43	95,01	96,5	96,93	96,65	96,79	96,22	97,15	97,36	96,79	97,5	
[29] <i>Actinomadura miaoliensis</i>	95,08	96,08	95,51	94,65	98,64	96,22	95,36	94,86	94,79	95,44	95,36	96,29	95,93	97

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 5 de 10)

		[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]
[30]	<i>Actinomadura rifamycini</i>	95,72	96,15	96,22	93,87	94,44	95,15	95,08	96,29	95,51	95,86	95,86	95,08	96,01	95,51
[31]	<i>Actinomadura rayongensis</i>	95,29	95,72	96,36	94,15	95,51	95,65	94,94	95,58	95,08	95,36	96,08	95,51	95,72	95,65
[32]	<i>Actinomadura napierensis</i>	97,15	97,93	97,57	95,72	95,36	96,36	97,86	96,93	96,65	97,79	97,57	96,36	97,86	97,29
[33]	<i>Actinomadura rugatobispora</i>	95,58	95,93	96,15	93,79	94,01	95,58	95,08	96,29	95,58	96,08	95,79	95,36	96,43	95,22
[34]	<i>Actinomadura rubrobrunea</i>	93,51	94,37	94,08	93,65	97,36	95,36	93,87	93,51	93,44	94,58	93,87	95,51	94,51	95,22
[35]	<i>Actinomadura scrupuli</i>	94,01	94,65	94,79	93,3	94,22	95,22	94,29	94,22	94,15	94,65	94,51	95,22	94,72	95,86
[36]	<i>Actinomadura umbrina</i>	94,15	94,94	94,79	93,65	93,65	94,58	94,72	94,29	94,22	95,08	94,58	94,51	95,22	95,15
[37]	<i>Actinomadura sputi</i>	94,94	96,22	95,51	98,29	94,72	95,01	95,51	94,94	94,94	95,93	95,29	95,01	96,22	95,15
[38]	<i>Actinomadura viridilutea</i>	93,44	94,29	94,01	93,58	97,29	95,29	93,87	93,44	93,37	94,51	93,79	95,44	94,44	95,15
[39]	<i>Actinomadura sediminis</i>	96,22	96,79	96,58	94,29	93,87	95,15	95,72	95,79	95,29	96,43	96,22	95,08	96,5	95,15
[40]	<i>Actinomadura yumaensis</i>	95,58	96,58	97	95,01	94,44	95,15	95,51	96,43	95,44	96,22	96,72	95,08	96,86	96,22
[41]	<i>Actinomadura vinacea</i>	96,22	96,5	96,72	94,94	94,58	95,65	95,58	96,22	95,58	96,58	96,65	95,51	96,65	96,01
[42]	<i>Actinomadura xylanilytica</i>	96,65	97,57	98	95,29	95,86	96,43	96,93	97,36	96,65	97,43	97,72	96,29	97,5	98,29
[43]	<i>Actinomadura livida</i>	95,65	96,36	96,36	95,65	95,15	94,65	95,58	95,79	95,36	95,93	96,29	94,58	96,22	95,72
[44]	<i>Actinomadura hibisca</i>	95,36	96,22	96,36	94,22	96,01	97,57	95,29	95,72	95,01	95,93	95,93	97,57	96,15	97
[45]	<i>Actinomadura meridiana</i>	96,79	97	96,86	93,94	94,08	94,65	95,93	96,08	95,86	96,5	96,86	94,58	96,58	95,72
[46]	<i>Actinomadura fulvescens</i>	97	97,65	97,29	94,86	95,58	96,22	96,5	96,65	96,15	96,93	97,22	96,08	97,5	97,65
[47]	<i>Actinomadura chibensis</i>	95,51	96,5	96,15	94,58	94,65	94,58	95,72	95,51	95,58	95,86	95,86	94,65	96,5	95,72
[48]	<i>Actinomadura catellatispora</i>	93,58	94,29	94,29	93,58	93,15	92,58	93,79	93,72	93,3	93,87	94,22	92,51	94,29	93,65
[49]	<i>Actinomadura pelletieri</i>	95,36	95,93	95,93	94,01	94,01	93,79	95,22	95,15	95,65	95,65	95,72	94,01	95,79	94,79
[50]	<i>Actinomadura oligospora</i>	95,08	95,86	95,58	93,94	96,15	96,43	95,15	94,86	94,86	95,36	95,58	96,5	95,79	96,22
[51]	<i>Actinomadura rudentiformis</i>	96,58	97,08	96,72	94,58	95,58	96,15	96,5	96,01	95,93	97,72	96,58	96,08	97,15	97,22
[52]	<i>Actinomadura rupiterrae</i>	93,65	94,65	94,29	93,58	94,86	95,51	94,44	93,65	93,44	95,22	94,29	95,58	94,79	95,08
[53]	<i>Actinomadura verrucospora</i>	97,15	97,5	98,72	94,72	94,44	95,29	96,08	99,29	97,93	97,29	98,15	95,08	97,86	96,79
[54]	<i>Actinomadura viridis</i>	96,22	96,5	96,72	95,08	94,51	95,44	95,65	96,22	95,51	96,58	96,65	95,29	96,58	95,93

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 6 de 10)

		[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]
[55]	<i>Actinomadura syzygii</i>	96,65	97,65	97,15	94,58	95,36	95,44	96,43	96,5	96,36	96,65	96,72	95,36	97,43	96,65
[56]	<i>LGMB487</i>	95,86	96,79	96,5	94,58	95,51	96,22	96,79	95,86	95,79	97,29	96,36	96,08	96,79	97,5
[57]	<i>LGMB466</i>	96,08	97	96,72	94,79	96,22	96,79	96,93	96,08	96,01	97,5	96,58	96,65	97	98,36
[58]	<i>Streptomyces glauciniger</i>	89,51	89,8	90,09	87,52	89,8	90,66	89,44	89,44	89,23	90,01	89,87	90,66	89,66	90,51

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 7 de 10)

		[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]	[41]	[42]
[30]	<i>Actinomadura rifamycini</i>	94,15													
[31]	<i>Actinomadura rayongensis</i>	95,65	93,87												
[32]	<i>Actinomadura napierensis</i>	95,93	95,65	95,51											
[33]	<i>Actinomadura rugatobispora</i>	94,29	94,58	94,51	95,86										
[34]	<i>Actinomadura rubrobrunea</i>	96,5	93,65	94,44	94,72	93,58									
[35]	<i>Actinomadura scrupuli</i>	94,51	94,01	93,37	95,08	93,44	93,3								
[36]	<i>Actinomadura umbrina</i>	94,08	93,22	94,08	95,08	93,65	92,87	94,94							
[37]	<i>Actinomadura sputi</i>	94,72	94,15	94,37	96,15	94,72	94,58	93,72	93,94						
[38]	<i>Actinomadura viridilutea</i>	96,43	93,58	94,37	94,65	93,58	99,43	93,22	92,8	94,51					
[39]	<i>Actinomadura sediminis</i>	93,94	96,15	94,58	96,22	94,58	93,79	93,37	93,51	95,15	93,58				
[40]	<i>Actinomadura yumaensis</i>	94,58	94,29	94,37	96,43	97	93,37	94,29	94,51	95,15	93,3	94,44			
[41]	<i>Actinomadura vinacea</i>	94,94	94,29	95,08	96,08	98,15	93,79	94,15	94,44	95,29	93,72	94,79	98,15		
[42]	<i>Actinomadura xylanilytica</i>	96,29	95,01	96,36	97,72	95,65	94,72	95,29	95,51	95,29	94,65	95,58	96,5	96,29	
[43]	<i>Actinomadura livida</i>	95,01	94,15	94,58	96,22	96,36	93,87	94,51	94,65	95,51	93,79	94,15	97,57	97,43	96,15
[44]	<i>Actinomadura hibisca</i>	96,5	94,94	95,58	96,01	95,29	95,08	94,51	93,79	94,58	95,01	94,72	95,72	95,79	96,86
[45]	<i>Actinomadura meridiana</i>	94,08	94,79	94,72	95,93	94,86	93,01	93,87	94,22	94,15	92,94	95,36	95,36	95,44	95,86
[46]	<i>Actinomadura fulvescens</i>	95,93	95,44	95,15	97,15	96,01	94,72	95,08	94,29	95,15	94,65	95,36	96,22	96,5	97,43
[47]	<i>Actinomadura chibensis</i>	95,08	94,01	94,15	96,36	94,72	93,87	94,08	95,15	94,79	93,79	94,29	96,29	95,58	96,01
[48]	<i>Actinomadura catellatispora</i>	93,01	92,01	92,72	94,15	94,01	91,87	92,44	92,58	93,44	91,8	92,08	95,22	95,08	94,08

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 8 de 10)

		[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]	[41]	[42]
[49]	<i>Actinomadura pelletieri</i>	93,94	94,29	94,08	95,29	94,58	92,94	93,44	93,72	94,51	92,87	94,65	94,86	94,58	95,08
[50]	<i>Actinomadura oligospora</i>	96,15	94,51	95,29	95,79	95,08	95,15	94,37	93,3	94,37	95,08	93,87	95,01	95,29	95,79
[51]	<i>Actinomadura rudentiformis</i>	95,79	95,65	94,58	96,72	95,93	94,86	94,72	94,79	95,08	94,79	95,51	95,93	96,15	96,65
[52]	<i>Actinomadura rupiterrae</i>	95,22	93,51	94,58	94,44	94,29	94,37	93,65	93,65	94,22	94,29	93,3	94,58	94,94	94,44
[53]	<i>Actinomadura verrucospora</i>	94,72	96,08	95,44	96,86	96,29	93,37	94,37	94,29	94,86	93,3	95,58	96,29	96,22	97,15
[54]	<i>Actinomadura viridis</i>	95,01	94,29	95,29	96,08	97,72	93,44	94,29	94,44	95,08	93,37	94,94	98	99,36	96,43
[55]	<i>Actinomadura syzygii</i>	96,01	94,51	95,01	96,86	95,65	94,01	94,01	94,79	94,86	93,94	95,29	96,08	96,08	97
[56]	<i>LGMB487</i>	96,15	95,58	94,51	97,15	95,36	94,58	95,79	95,15	95,08	94,51	94,79	95,79	95,65	96,93
[57]	<i>LGMB466</i>	96,86	95,79	95,22	97,43	95,29	95,29	96,22	95,58	95,29	95,22	95,01	95,72	95,58	97,72
[58]	<i>Streptomyces glauciniger</i>	90,09	89,37	89,44	90,23	88,73	90,3	90,51	89,44	88,09	90,16	88,87	88,8	88,66	90,37

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*(Continua 9 de 10)

		[43]	[44]	[45]	[46]	[47]	[48]	[49]	[50]	[51]	[52]	[53]	[54]	[55]	[56]	[57]	[58]
[43]	<i>Actinomadura livida</i>	0															
[44]	<i>Actinomadura hibisca</i>	95,15															
[45]	<i>Actinomadura meridiana</i>	95,58	95,22														
[46]	<i>Actinomadura fulvescens</i>	96,43	97,5	96,79													
[47]	<i>Actinomadura chibensis</i>	96,15	95,44	96,08	96,29												
[48]	<i>Actinomadura catellatispora</i>	97,65	93,08	93,51	94,37	94,15											
[49]	<i>Actinomadura pelletieri</i>	95,36	94,58	96,65	95,58	96,22	93,3										
[50]	<i>Actinomadura oligospora</i>	95,29	96,58	95,01	96,65	95,36	93,22	94,79									
[51]	<i>Actinomadura rudentiformis</i>	95,86	97,15	96,43	98,64	96,08	93,79	95,79	95,93								
[52]	<i>Actinomadura rupiterrae</i>	94,72	95,79	94,08	95,01	94,44	92,72	93,65	96,72	95,72							
[53]	<i>Actinomadura verrucospora</i>	95,79	95,72	96,15	96,79	95,51	93,72	95,15	94,86	96,15	93,65						
[54]	<i>Actinomadura viridis</i>	97,5	95,86	95,58	96,43	95,58	95,15	94,51	95,01	96,01	94,86	96,22					
[55]	<i>Actinomadura syzygii</i>	96,01	96,5	96,79	97,29	98,57	94,01	96,58	95,51	96,86	94,58	96,5	96,01				

ANEXO 1 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Actinomadura*.
(Continua 10 de 10)

	[43]	[44]	[45]	[46]	[47]	[48]	[49]	[50]	[51]	[52]	[53]	[54]	[55]	[56]	[57]	[58]
[56] <i>LGMB487</i>	96,01	96,5	95,58	97,57	95,86	93,94	95,36	96,5	98	95,65	95,86	95,65	96,29			
[57] <i>LGMB466</i>	95,79	96,5	95,44	97,29	95,72	93,72	95,22	96,29	97,72	95,44	95,93	95,58	96,15	98,86		
[58] <i>Streptomyces glauciniger</i>	89,02	89,87	89,23	90,16	88,73	87,02	88,37	89,44	89,94	89,23	89,51	88,73	89,16	90,37	90,8	0

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 2 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Aeromicrobium*

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[1] <i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>														
[2] <i>Aeromicrobium erythreum</i>	97,6													
[3] <i>Aeromicrobium fastidiosum</i>	97,6	98,13												
[4] <i>Aeromicrobium flavum</i>	96,33	96,33	96,03											
[5] <i>Aeromicrobium ginsengisoli</i>	98,43	97,38	97,75	96,86										
[6] <i>Aeromicrobium halocynthiae</i>	97,38	97,46	96,11	96,11	97,68									
[7] <i>Aeromicrobium marinum</i>	98,13	96,93	97,46	96,26	99,1	97,38								
[8] <i>Aeromicrobium massiliense</i>	96,26	96,26	95,88	95,66	95,96	95,06	95,21							
[9] <i>Aeromicrobium panaciterrae</i>	97,68	96,78	97,01	96,93	98,95	96,93	98,2	95,96						
[10] <i>Aeromicrobium tamlense</i>	96,33	96,48	96,11	98,88	96,71	96,41	96,41	95,43	96,63					
[11] <i>Aeromicrobium camelliae</i>	96,63	96,78	96,41	95,36	95,88	95,88	95,43	95,58	95,28	95,73				
[12] <i>Nocardioides albus</i>	91,84	91,77	92,37	92,07	91,99	91,17	91,39	92,81	92,22	92,14	92,14			
[13] <i>Aeromicrobium ponti</i>	97,83	98,2	96,78	95,66	97,23	97,31	97,23	95,73	96,48	96,11	95,96	91,32		
[14] <i>LGMB491</i>	98,2	98,35	97,08	96,41	97,9	97,9	97,75	95,81	97,16	96,18	95,88	91,17	99,25	

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 3 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, espécies localizadas no clado juntamente com LGMB471 – *Microbacterium* sp.

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
[1]	<i>Agrococcus jenensis</i>	0	93,42	93	91,67	93,21	93,11	92,9	92,08
[2]	<i>LGMB471</i>	93,42	0	98,66	97,63	99,07	98,97	98,87	97,94
[3]	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	93	98,66	0	97,84	99,59	99,49	98,77	98,25
[4]	<i>Microbacterium luteolum</i>	91,67	97,63	97,84	0	98,25	98,15	98,15	97,74
[5]	<i>Microbacterium maritypicum</i>	93,21	99,07	99,59	98,25	0	99,9	99,18	98,66
[6]	<i>Microbacterium oxydans</i>	93,11	98,97	99,49	98,15	99,9	0	99,07	98,56
[7]	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	92,9	98,87	98,77	98,15	99,18	99,07	0	98,46
[8]	<i>Microbacterium saperdae</i>	92,08	97,94	98,25	97,74	98,66	98,56	98,46	0

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 4 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Microbispora*
(1 de 2)

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[1]	<i>LGMB461</i>														
[2]	<i>LGMB465</i>	99,84													
[3]	<i>Microbispora chromogenes</i>	97,63	97,78												
[4]	<i>Microbispora indica</i>	99,37	99,53	97,63											
[5]	<i>Microbispora karnatakensis</i>	99,21	99,37	97,15	99,21										
[6]	<i>Microbispora parva</i>	98,58	98,73	97,31	98,58	98,73									
[7]	<i>Microbispora thermodiastatica</i>	97,47	97,63	95,89	97,47	97,63	97,63								
[8]	<i>Microbispora thermorosea</i>	96,04	96,2	97,31	96,04	96,2	95,89	96,68							
[9]	<i>Microbispora amethystogenes</i>	98,42	98,58	96,99	98,73	98,58	98,89	97,47	95,41						
[10]	<i>Microbispora corallina</i>	97,94	98,1	97,78	97,94	98,1	97,78	96,84	97,15	97,31					
[11]	<i>Microbispora mesophila</i>	92,25	92,41	91,46	92,56	92,09	91,61	91,3	90,82	91,77	92,56				
[12]	<i>Microbispora aerata</i>	98,1	98,26	96,52	98,1	98,26	98,26	99,21	96,84	98,1	97,47	91,61			
[13]	<i>Microbispora rosea</i>	98,73	98,89	96,99	99,37	98,58	97,94	97,31	95,57	98,1	97,31	92,25	97,78		
[14]	<i>Microbispora siamensis</i>	96,68	96,84	98,1	96,68	96,84	96,68	95,57	96,68	96,04	97,15	90,35	96,2	96,04	
[15]	<i>LGMB250</i>	99,68	99,84	97,94	99,68	99,21	98,58	97,47	96,04	98,73	97,94	92,56	98,1	99,05	96,68
[16]	<i>LGMB251</i>	99,53	99,68	97,78	99,53	99,05	98,42	97,31	96,04	98,58	97,78	92,56	97,94	98,89	96,52
[17]	<i>LGMB252</i>	69,78	69,94	67,88	69,62	69,62	68,67	68,04	67,09	68,83	68,04	64,08	68,67	69,15	67,72
[18]	<i>LGMB253</i>	69,94	70,09	68,35	69,78	69,78	69,15	68,2	67,25	69,15	68,2	64,4	68,83	69,3	67,88
[19]	<i>LGMB255</i>	99,21	99,37	97,47	99,21	98,73	98,1	96,99	95,57	98,26	97,47	92,25	97,63	98,58	96,2
[20]	<i>LGMB256</i>	97,47	97,63	99,21	97,47	96,99	96,68	95,73	97,15	96,52	97,63	91,14	96,36	96,84	97,63
[21]	<i>LGMB257</i>	95,09	95,25	96,99	95,09	94,62	94,62	93,67	95,25	94,15	95,57	89,4	94,3	94,46	95,41
[22]	<i>LGMB258</i>	99,05	99,21	96,99	98,73	98,58	97,94	96,84	95,41	97,78	97,31	91,61	97,47	98,1	96,04
[23]	<i>LGMB259</i>	99,84	100	97,78	99,53	99,37	98,73	97,63	96,2	98,58	98,1	92,41	98,26	98,89	96,84
[24]	<i>LGMB260</i>	99,68	99,84	97,94	99,68	99,21	98,58	97,47	96,04	98,73	97,94	92,56	98,1	99,05	96,68
[25]	<i>LGMB261</i>	99,53	99,68	97,78	99,53	99,05	98,42	97,31	95,89	98,58	97,78	92,41	97,94	98,89	96,52
[26]	<i>Actinoadura echinospora</i>	93,83	93,99	93,35	93,99	93,51	93,67	93,51	92,72	93,83	93,99	93,35	93,99	93,51	92,09

ANEXO 4 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Microbispora*
(continua 2 de 2)

		[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]
[16]	LGMB251	99,84											
[17]	LGMB252	69,94	70,09										
[18]	LGMB253	70,09	70,25	99,21									
[19]	LGMB255	99,53	99,37	69,62	69,78								
[20]	LGMB256	97,78	97,63	67,72	67,88	97,31							
[21]	LGMB257	95,41	95,41	65,98	66,3	94,94	97,63						
[22]	LGMB258	99,05	98,89	69,3	69,46	98,58	97,78	95,41					
[23]	LGMB259	99,84	99,68	69,94	70,09	99,37	97,63	95,25	99,21				
[24]	LGMB260	100	99,84	69,94	70,09	99,53	97,78	95,41	99,05	99,84			
[25]	LGMB261	99,84	99,68	69,78	69,94	99,37	97,63	95,25	98,89	99,68	99,84		
[26]	<i>Actinomadura echinospora</i>	94,15	93,99	64,4	64,72	93,83	93,04	91,14	93,35	93,99	94,15	93,99	

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 5 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Micrococcus*

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
[1]	LGMB 485											
[2]	<i>Micrococcus flavus</i>	98,75										
[3]	<i>Micrococcus antarcticus</i>	99,17	97,92									
[4]	<i>Micrococcus lylae</i>	98,96	97,71	98,12								
[5]	<i>Micrococcus aloeverae</i>	100	98,75	99,17	98,96							
[6]	<i>Micrococcus cohnii</i>	99,17	97,92	99,17	98,54	99,17						
[7]	<i>Micrococcus luteus</i>	99,58	98,33	98,75	98,54	99,58	98,75					
[8]	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	100	98,75	99,17	98,96	100	99,17	99,58				
[9]	<i>Micrococcus terreus</i>	97,92	97,08	97,92	97,71	97,92	98,33	97,92	97,92			
[10]	<i>Micrococcus endophyticus</i>	99,79	98,54	98,96	98,75	99,79	98,96	99,38	99,79	97,71		
[11]	<i>Citricoccus parietis</i>	97,71	96,46	97,71	97,5	97,71	97,71	97,29	97,71	97,71	97,5	0

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 6 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Sphaerisporangium*

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]
[1] <i>LGMB 482</i>												
[2] <i>Sphaerisporangium melleum</i>	99,4											
[3] <i>Sphaerisporangium cinnabarium</i>	98,89	98,49										
[4] <i>Sphaerisporangium aureirubrum</i>	96,18	95,98	96,68									
[5] <i>Sphaerisporangium rufum</i>	97,48	97,18	98,19	96,28								
[6] <i>Sphaerisporangium album</i>	96,48	96,38	96,98	96,48	97,69							
[7] <i>Sphaerisporangium flaviroseum</i>	96,98	97,18	97,89	96,68	97,18	97,38						
[8] <i>Sphaerisporangium krabiense</i>	97,79	98,19	97,69	96,18	97,38	97,08	97,08					
[9] <i>Sphaerisporangium rubeum</i>	96,18	96,18	96,68	98,29	96,78	96,78	96,38	96,28				
[10] <i>Sphaerisporangium siamense</i>	97,59	97,38	96,88	95,98	97,38	97,28	96,18	98,09	96,08			
[11] <i>Sphaerisporangium viridalbum</i>	97,69	98,09	96,98	95,77	96,78	96,28	97,59	97,28	96,18	97,28		
[12] <i>Planobispora rosea</i>	95,37	95,77	95,37	93,76	94,67	94,16	94,87	95,67	94,27	94,37	95,67	

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 7 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Streptomyces*
(1 de 2)

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[1]	LGMB483														
[2]	<i>Streptomyces</i> <i>prasinusporus</i>	97,7													
[3]	<i>Streptomyces</i> <i>hyderabadensis</i>	97,84	97,12												
[4]	<i>Streptomyces</i> <i>parvulus</i>	98,63	97,7	98,85											
[5]	<i>Streptomyces</i> <i>spinoverrucosus</i>	98,56	97,92	98,13	98,78										
[6]	<i>Streptomyces</i> <i>lomondensis</i>	98,99	97,84	98,63	99,21	98,71									
[7]	<i>Streptomyces</i> <i>coerulescens</i>	99,28	97,63	98,06	98,99	98,78	99,21								
[8]	<i>Streptomyces</i> <i>bellus</i>	99,28	97,63	98,06	98,99	98,78	99,21	100							
[9]	<i>Streptomyces</i> <i>lusitanus</i>	99,57	98,06	98,2	98,99	98,99	99,35	99,28	99,28						
[10]	<i>Streptomyces</i> <i>thermocarboxydus</i>	99,86	97,7	97,84	98,63	98,56	98,99	99,28	99,28	99,57					
[11]	<i>Streptomyces</i> <i>speibonae</i>	98,71	98,06	98,13	98,63	98,35	98,71	98,78	98,78	98,99	98,71				
[12]	<i>Streptomyces</i> <i>longispororuber</i>	99,07	98,13	98,06	98,99	98,49	99,07	99,21	99,21	99,35	99,07	99,42			
[13]	<i>Streptomyces</i> <i>viridodiataticus</i>	98,78	97,63	98,35	98,71	98,35	98,71	99,14	99,14	99,07	98,78	99,07	99,42		
[14]	<i>Streptomyces</i> <i>albogriseolus</i>	98,78	97,63	98,35	98,71	98,35	98,71	99,14	99,14	99,07	98,78	99,07	99,42	100	
[15]	<i>Streptomyces</i> <i>erythrogriseus</i>	98,56	98,06	97,7	98,49	98,35	98,49	98,92	98,92	98,85	98,56	98,99	99,21	99,21	99,21
[16]	<i>Streptomyces</i> <i>griseoincarnatus</i>	98,56	98,06	97,7	98,49	98,35	98,49	98,92	98,92	98,85	98,56	98,99	99,21	99,21	99,21
[17]	<i>Streptomyces</i> <i>griseosporus</i>	98,42	97,77	97,56	98,27	98,27	98,2	98,42	98,42	98,56	98,42	98,2	98,49	98,2	98,2
[18]	<i>Streptomyces</i> <i>chromofuscus</i>	98,2	98,63	97,99	98,42	98,63	98,56	98,42	98,42	98,56	98,2	98,78	98,56	98,2	98,2
[19]	<i>Streptomyces</i> <i>glomeratus</i>	98,06	97,92	97,92	98,35	98,13	98,49	98,2	98,2	98,42	98,06	98,63	98,49	98,27	98,27
[20]	<i>Streptomyces</i> <i>chiangmaiensis</i>	98,13	97,77	97,92	98,56	98,2	98,63	98,27	98,27	98,35	98,13	98,49	98,42	98,06	98,06
[21]	<i>Streptomyces</i> <i>lannensis</i>	97,77	97,41	97,56	98,06	97,84	97,99	97,63	97,63	97,99	97,77	98,35	98,13	97,77	97,77
[22]	<i>Streptomyces</i> <i>leeuwenhoekii</i>	98,27	97,48	98,13	98,63	98,42	98,35	98,2	98,2	98,63	98,27	98,49	98,42	98,35	98,35
[23]	<i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i>	97,77	97,77	97,92	98,2	98,27	98,2	97,92	97,92	98,06	97,77	98,2	97,92	97,77	97,77
[24]	<i>Streptomyces albus</i> <i>subsp albus</i>	95,61	96,12	95,54	95,4	95,4	95,54	95,26	95,26	95,69	95,54	95,69	95,69	96,05	96,05
[25]	<i>Streptomyces</i> <i>somaliensis</i>	98,13	97,41	97,41	98,06	97,99	97,99	97,92	97,92	98,2	98,06	98,2	97,92	97,77	97,77

ANEXO 7 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Streptomyces*
(Continua 2 de 2)

		[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]
[15]	<i>Streptomyces erythrogriseus</i>											
[16]	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	100										
[17]	<i>Streptomyces griseosporus</i>	97,99	97,99									
[18]	<i>Streptomyces chromofuscus</i>	98,13	98,13	98,2								
[19]	<i>Streptomyces glomeratus</i>	98,2	98,2	98,42	98,71							
[20]	<i>Streptomyces chiangmaiensis</i>	97,99	97,99	98,06	98,99	98,63						
[21]	<i>Streptomyces lannensis</i>	97,7	97,7	97,7	98,35	98,42	98,63					
[22]	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	98,27	98,27	98,35	98,35	98,49	98,56	98,35				
[23]	<i>Streptomyces mexicanus</i>	97,7	97,7	97,92	98,99	98,56	98,35	97,77	98,42			
[24]	<i>Streptomyces albus subsp albus</i>	96,05	96,05	95,9	95,97	95,76	95,54	95,11	95,97	96,62		
[25]	<i>Streptomyces somaliensis</i>	97,7	97,7	98,56	98,2	98,27	98,13	97,77	98,56	98,13	95,9	

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 8 - Matriz de similaridade percentual, para o gene 16S rRNA, para o gênero *Williamsia*

		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
[1]	<i>Williamsia deligens</i>	0	95,25	95,17	95,77	98,14	95,99	97,47	97,55	95,99	97,4	91,16
[2]	<i>Williamsia faeni</i>	95,25	0	98,22	97,99	96,06	98,22	95,77	94,28	94,06	94,28	91,9
[3]	<i>Williamsia limnetica</i>	95,17	98,22	0	98,74	96,29	98,96	96,58	94,87	94,95	94,87	92,12
[4]	<i>Williamsia marianensis</i>	95,77	97,99	98,74	0	96,88	99,78	96,58	95,1	95,02	95,02	91,6
[5]	<i>Williamsia maris</i>	98,14	96,06	96,29	96,88	0	97,1	99,33	96,66	96,51	96,51	91,83
[6]	<i>Williamsia muralis</i>	95,99	98,22	98,96	99,78	97,1	0	96,81	95,32	95,17	95,25	91,83
[7]	<i>Williamsia phyllosphaerae</i>	97,47	95,77	96,58	96,58	99,33	96,81	0	96,58	96,66	96,43	92,35
[8]	<i>Williamsia serinedens</i>	97,55	94,28	94,87	95,1	96,66	95,32	96,58	0	95,77	99,85	92,05
[9]	<i>Williamsia sterculiae</i>	95,99	94,06	94,95	95,02	96,51	95,17	96,66	95,77	0	95,77	92,05
[10]	LGMB479	97,4	94,28	94,87	95,02	96,51	95,25	96,43	99,85	95,77	0	92,05
[11]	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	91,16	91,9	92,12	91,6	91,83	91,83	92,35	92,05	92,05	92,05	0

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 9 – Atividade antimicrobiana de extratos dos actinomicetos endofíticos produzidos em diferentes meios e temperaturas sobre patógenos clínicos de interesse.

Identificação	Linhagem	Atividade antimicrobiana (zona de inibição em mm)											
		<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina				<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina				<i>Escherichia coli</i>			
		Meio SG		Meio R5A		Meio SG		Meio R5A		Meio SG		Meio R5A	
		28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB466	9.75 ± 0.5	11.25 ± 0.5	11.25 ± 0.5	9 ± 0.8	9.5 ± 0.58	9.25 ± 0.5	9.5 ± 0.6	9.5 ± 0.6	12,0	12.75 ± 0.5	12.75 ± 0.5	10.75 ± 0.5
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB487	9.75 ± 0.5	11.75 ± 1	11.75 ± 1	9.5 ± 0.6	10.5 ± 1	9.5 ± 0.58	9.5 ± 0.6	9 ± 0.8	11.0	11.5 ± 0.6	12.25 ± 1	11.0
<i>Aeromicrobium ponti</i>	LGMB491	20.5 ± 0.6	22 ± 1.3	19.25 ± 1.3	15.75 ± 1.7	24.2 ± 2.06	19.8 ± 0.5	11.5 ± 1.3	17.25 ± 1.7	11.5 ± 1	12 ± 0.8	10.5 ± 0.6	10.25 ± 0.5
<i>Microbacterium</i> sp.	LGMB471	11.25 ± 1	9.5 ± 1	9.5 ± 1	11 ± 1.2	11.25 ± 0.96	8.25 ± 1.3	11.75 ± 1.5	9.25 ± 0.5	11.25 ± 0.5	12.25 ± 0.5	13 ± 0.8	11.0
<i>Microbisporasp.</i>	LGMB461	8,75 ± 1,5	9,5 ± 1,0	9,5 ± 1,0	9,25 ± 1,5	9,75 ± 1,7	8,5 ± 1	10,75 ± 0.5	8.75 ± 0.5	12.75 ± 0.5	9.5 ± 0.6	12.25 ± 1	12.5 ± 0.6
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB465	10 ± 0.8	9.25 ± 0.5	9.25 ± 0.5	9.5 ± 0.6	9.5 ± 1	9.75 ± 0.96	8.0	11.5 ± 0.6	13.25 ± 1	11.5 ± 0.6	8.0	10.5 ± 0.6
<i>Micrococcus</i> sp.	LGMB485	10.25 ± 0.5	12.5 ± 1.7	12.5 ± 1.7	10.5 ± 1.3	10 ± 0.82	11.2 ± 1.26	10 ± 1.4	8.75 ± 0.5	10.5 ± 0.6	10.75 ± 0.5	12.75 ± 0.5	10 ± 0.8
<i>Sphaerisporangium</i> sp.	LGMB482	10.5 ± 1.3	10.25 ± 1.7	10.25 ± 1.7	11,0	9.5 ± 0.58	10.5 ± 1.3	9.5 ± 0.6	9.5 ± 0.6	11 ± 0.8	9.75 ± 1	12 ± 0.8	11 ± 0.8
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	LGMB483	10.75 ± 1.5	10.0	10.0	11.25 ± 1.0	11.2 ± 0.96	11.2 ± 0.96	8.75 ± 1.5	8.5 ± 1	11.5 ± 1.3	11 ± 0.8	11,0	8.25 ± 0.5
<i>Williamsiaseerinedens</i>	LGMB479	12 ± 1.8	9.75 ± 2.2	9.75 ± 2.2	10.25 ± 0.5	12 ± 1.83	10.2 ± 0.96	10.0	10.25 ± 0.96	11.5 ± 0.6	9.5 ± 0.6	13.5 ± 1.3	12.25 ± 1

NOTA: Média ± desvio padrão.

Staphylococcus aureus sensível a meticilina: Controle positivo (Oxacilina 1µg/disco): 19 ± 0,7; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Staphylococcus aureus resistente a meticilina: Controle positivo (Oxacilina 6µg/disco): 8; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Escherichia coli: Controle positivo (Ampicilina 10µg/disco): 8,25 ± 0,4; Controle negativo (Metanol) 0,0.

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 9 – Atividade antimicrobiana de extratos dos actinomicetos endofíticos produzidos em diferentes meios e temperaturas sobre patógenos clínicos de interesse. (**Continua**)

	Gênero Linhagem	Atividade antimicrobiana (zona de inibição em mm)											
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Anexo 4)				<i>Acinetobacter baumannii</i> (Anexo 5)				<i>Candida albicans</i> (Anexo 6)			
		Meio SG		Meio R5A		Meio SG		Meio R5A		Meio SG		Meio R5A	
		28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB466	9.25 ± 1	10 ± 0.8	9 ± 0.8	8.5 ± 1.3	10.5 ± 0.6	10 ± 0.8	10.5 ± 0.6	9.75 ± 1.3	9.75 ± 1	10.25 ± 0.5	9.75 ± 1.3	10 ± 0.8
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB487	10.25 ± 1	7.75 ± 1	9.25 ± 0.5	7.75 ± 1	9.25 ± 0.9	10 ± 0.8	9.25 ± 1.9	9.5 ± 0.6	8 ± 0.8	7.5 ± 0.6	10.75 ± 1.9	7.75 ± 0.5
<i>Aeromicrobium pontii</i>	LGMB491	10.5 ± 1	10.5 ± 2.9	9 ± 1.2	13 ± 1.8	12.5 ± 1	10.5 ± 2.1	9 ± 0.8	11.75 ± 1	10.25 ± 1.3	8.5 ± 1	8 ± 1.4	10.00
<i>Microbacterium</i> sp.	LGMB471	9.0	10 ± 0.8	10.25 ± 1	10 ± 1.4	9.5 ± 0.6	10.5 ± 1.7	9.75 ± 0.5	9.25 ± 1	13.5 ± 0.6	10.75 ± 1.3	11.00	9.75 ± 0.5
<i>Microbisporasp.</i>	LGMB461	8.25 ± 0.5	9.0	11.25 ± 1.5	9.0	8.5 ± 1	9.75 ± 0.5	9.00	10.75 ± 1	8.75 ± 1.5	9.25 ± 1	8.5 ± 0.6	8.75 ± 0.5
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB465	11 ± 1.4	10 ± 0.8	9.5 ± 0.6	10.5 ± 1	11.00	9 ± 0.8	10.25 ± 1	11.00	10.75 ± 0.5	10.25 ± 1	9.75 ± 0.5	11 ± 2
<i>Micrococcus</i> sp.	LGMB485	9.0	10 ± 1.2	8.75 ± 1	9.0	10 ± 0.8	9.5 ± 1	9.25 ± 1.5	11.25 ± 0.5	11.25 ± 1	10.25 ± 0.5	7.5 ± 0.6	9.5 ± 1
<i>Sphaerisporangium</i> sp.	LGMB482	10.5 ± 1.7	8.75 ± 0.5	10.25 ± 1	9.75 ± 1	11.25 ± 0.9	9.75 ± 1.7	10 ± 0.8	10 ± 0.8	11.75 ± 1.5	10.75 ± 1	13 ± 0.8	11.75 ± 1.5
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	LGMB483	11 ± 1.4	11.25 ± 1.5	7.5 ± 0.6	8.5 ± 0.6	9.75 ± 0.5	11 ± 1.4	7.75 ± 1	8.75 ± 0.9	10 ± 1.4	8.75 ± 0.5	7.75 ± 0.5	7.5 ± 0.6
<i>Williamsiasedendens</i>	LGMB479	10.75 ± 2.1	10 ± 1.2	10 ± 1.2	9.5 ± 0.6	12.5 ± 1.9	9.5 ± 0.6	10.5 ± 1	10.75 ± 1.3	11 ± 2	11 ± 2	12.25 ± 1.7	10.25 ± 1.5

NOTA: Média ± desvio padrão. *Pseudomonas aeruginosa*: Controle positivo (Meropenem 10µg/disco):23; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Acinetobacter baumannii: Controle positivo (Vancomicina 30µg/disco):0,0; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Candida albicans: Controle positivo (Anfotericina B 5µg/disco):25; Controle negativo (Metanol) 0,0.

FONTE: O autor (2017)

ANEXO 9 – Atividade antimicrobiana de extratos dos actinomicetos endofíticos produzidos em diferentes meios e temperaturas sobre patógenos clínicos de interesse. (*Continua*)

Atividade antimicrobiana (zona de inibição em mm)													
Linhagem		<i>Enterobacter Cloacae</i> produtor de VIM (Anexo 7)				<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Anexo 8)				<i>Klebissella pneumoniae</i> produtor de KPC (Anexo 9)			
		MeioSG		MeioR5A		MeioSG		MeioR5A		MeioSG		MeioR5A	
		28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C	28°C	36°C
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB466	9.75 ± 0.5	10 ± 0.8	10.25 ± 0.5	10.5 ± 0.6	10.5 ± 1.3	11.75 ± 1	9.5 ± 0.6	9.25 ± 0.5	10.75 ± 0.5	10.5 ± 0.6	11.25 ± 1	10.25 ± 0.5
<i>Actinomadura</i> sp.	LGMB487	11.25 ± 0.5	10.5 ± 0.6	10.75 ± 0.5	9.5 ± 0.6	11.25 ± 1	9 ± 0.8	11 ± 0.8	9.00	9.75 ± 1	8.25 ± 0.5	10.25 ± 0.5	8.5 ± 0.6
<i>Aeromicrobium ponti</i>	LGMB491	10.75 ± 1	10.5 ± 1.3	12.25 ± 1.7	12.25 ± 1	13.5 ± 0.6	13.25 ± 1.5	9.00	12.25 ± 0.5	10 ± 0.8	10.75 ± 1	8.75 ± 0.5	10.5 ± 1
<i>Microbacterium</i> sp.	LGMB471	11.25 ± 0.5	10.00	10.00	10.25 ± 0.5	12.5 ± 0.6	9.75 ± 0.5	10.75 ± 0.5	10.5 ± 0.6	11.75 ± 0.5	9.75 ± 1	11.25 ± 0.5	10 ± 0.8
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB461	8.75 ± 1	10.25 ± 1	10.5 ± 1.3	10.75 ± 1	10.25 ± 1.3	10.5 ± 1.3	11 ± 0.8	10.25 ± 0.5	11 ± 1.8	10.25 ± 0.5	9.25 ± 0.5	11.00
<i>Microbispora</i> sp.	LGMB465	10.25 ± 1	9.5 ± 0.6	10.75 ± 0.5	10.25 ± 1.3	9.25 ± 1	9.75 ± 0.5	9.5 ± 1	9.5 ± 0.6	9.75 ± 0.9	11.5 ± 0.6	10 ± 0.8	9.25 ± 0.5
<i>Micrococcus</i> sp.	LGMB485	12.25 ± 1.3	11.5 ± 0.6	10.75 ± 1	10 ± 1.4	11.75 ± 0.5	10.00	10.5 ± 0.6	10.5 ± 0.6	9.5 ± 0.6	11.25 ± 0.5	8.5 ± 0.6	10.00
<i>Sphaerisporangium</i> sp.	LGMB482	11.5 ± 0.6	10.5 ± 0.6	10.75 ± 0.5	9.00	11.5 ± 1	10.75 ± 0.5	11.00	10.25 ± 1	12.75 ± 1.2	10.75 ± 0.5	12.00	9.75 ± 0.5
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	LGMB483	11.5 ± 0.6	12.00	10.25 ± 0.5	8.5 ± 0.6	11.5 ± 0.6	11.75 ± 1	9.75 ± 1	10.75 ± 1	11.00	12 ± 0.8	9.75 ± 0.9	8.5 ± 0.6
<i>Williamsia serinedens</i>	LGMB479	10.75 ± 0.5	10.5 ± 0.6	11.25 ± 0.5	9.25 ± 0.5	12.00	12.25 ± 1	12 ± 1.2	11.25 ± 1	12.75 ± 1.2	12.25 ± 1	12 ± 0.8	12.25 ± 1

NOTA: Média ± desvio padrão. *Enterobacter Cloacae* produtor de VIM: Controle positivo (Meropenem 10µg/disco):15; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Stenotrophomonas maltophilia: Controle positivo (Meropenem 10µg/disco):33,8±0,4; Controle negativo (Metanol) 0,0.

Klebissella pneumoniae produtor de KPC: Controle positivo (Meropenem 10µg/disco):17; Controle negativo (Metanol) 0,0.

FONTE: O autor (2017)

